THANDARA GARCIA RAVELLI

**SELEÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PHA SINTASES
PARA A CONSTRUÇÃO DE RECOMBINANTES EM *Burkholderia*
sacchari E *Pseudomonas* sp E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS COM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES MONOMERICAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

THANDARA GARCIA RAVELLI

**SELEÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PHA SINTASES
PARA A CONSTRUÇÃO DE RECOMBINANTES
EM *Burkholderia sacchari* E *Pseudomonas* sp E AVALIAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS COM
DIFERENTES COMPOSIÇÕES MONOMERICAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ravelli, Thandara Garcia.

Seleção de genes codificadores de PHA sintases para a construção de recombinantes em *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas* sp. e avaliação da produção de polihidroxialcanoatos com diferentes composições monoméricas / Thandara Garcia Ravelli. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biopolímeros.

Versão do título para o inglês: Selection of PHA synthases coding genes for the construction of recombinant *Burkholderia sacchari* and *Pseudomonas* sp. and evaluation of polyhydroxyalkanoate production with different monomer compositions.

1. PHA 2. PHA sintase 3. *Burkholderia* 4. *Pseudomonas* 5. Metagenômica I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0204/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thandara Garcia Ravelli.

Título da Dissertação: Seleção de genes codificadores de PHA sintases para a construção de recombinantes em *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas* sp. e avaliação da produção de polihidroxialcanoatos com diferentes composições monoméricas.

Orientador(a): Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 527/12 referente ao projeto intitulado: "*Construção de recombinantes portando genes selecionados numa biblioteca metagenômica e avaliação da capacidade de acúmulo de polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos (PHA)*" sob a responsabilidade de **Thandara Garcia Ravelli**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 13 de junho de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e pela oportunidade. Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, também pela orientação, pelas sugestões e discussões.

Aos meus pais Rosana e Virgílio pela dedicação, apoio, carinho e incentivo e principalmente por me darem a oportunidade de conquistar meus objetivos. Aos meus irmãos Katherine e Fernando e ao meu namorado Márcio, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos técnicos do laboratório: Aelson Luis dos Santos e Alexandre Aparecido, pelo apoio. Aos amigos, principalmente Aline, Diana, Thati, Jhoanne e Edmar, que foram fundamentais e sempre me ajudaram no que precisei.

Agradeço ao prof Steinbüchel pela gentil doação de genes relevantes ao trabalho

Agradeço a Deus pela saúde e pela força.

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

“Todo conhecimento é resposta a uma pergunta”

Gaston Bachelard

RESUMO

RAVELLI, T. G. **Seleção de genes codificadores de PHA sintases para a construção de recombinantes em *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas sp* e avaliação da produção de polihidroxicanoatos com diferentes composições monoméricas.** 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias a partir de fontes renováveis que despertam grande interesse industrial por serem termoplásticos biodegradáveis e biocompatíveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso em diversas aplicações. Os PHA podem ser formados por monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}) ou média (PHA_{MCL}), ou ainda, formar copolímeros (PHA_{SCL-co}-PHA_{MCL}) que têm propriedades intermediárias. Três aspectos são determinantes para a produção de PHA: a fonte de carbono, as vias metabólicas bacterianas e a enzima PHA sintase. A enzima PHA sintase catalisa a polimerização de moléculas de *R*-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero, sendo, assim, a enzima chave na biossíntese de PHA. São conhecidos quatro tipos de PHA sintases, de acordo com a especificidade pelo substrato e pela composição de peptídeos. Muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando diferentes composições do polímero. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi à busca por genes codificadores desta enzima, construção e avaliação de recombinantes portando tais genes para buscar materiais com novas propriedades e aplicações. Inicialmente buscou-se novos genes de PHA sintase a partir de 390 clones de uma biblioteca metagenômica previamente detectados por PCR como positivos para algum tipo de PHA sintase. Posteriormente, duas novas fontes de PHA sintase foram buscadas: genes codificadores de PHA sintase III de *Thiocapsa pfennigii* e *Allochromatium vinosum*. Dos 390 clones, apenas 2 mostraram resultado positivo para PHA sintase de classe II através de reação de PCR e de sequenciamento, apresentando similaridade com genes conhecidos. Pelo fato de que as PHA sintases do tipo II já terem sido amplamente estudadas, ao contrário daquelas do tipo III, mais promissoras para este trabalho, genes codificadores foram buscados para testar sua inserção em hospedeiros capazes de acumular altas concentrações de PHA, mas afetados na sua PHA sintase nativa (*Pseudomonas putida* e *Burkholderia sacchari*), avaliando-se o tipo de PHA produzido. Assim, recombinantes de *Pseudomonas sp* e *B. sacchari* foram construídos pela introdução de genes de *T. pfennigii* (*phaEC_{TP}*) e de *C. vinosum* (*phaEC_{CV}*) clonados em pBBR1-MCS2. A produção de PHA pelos recombinantes obtidos foi avaliada qualitativamente por testes de coloração com Sudan Black B, indicaram resultados positivos apenas em *Burkholderia sacchari* abrigando o gene de *C. vinosum* sendo que para *Pseudomonas putida* abrigando *phaEC_{CV}* e *phaEC_{TP}* e *Burkholderia sacchari* *phaEC_{TP}* o resultado foi negativo. Quantitativamente, a produção de PHA foi avaliada com ensaios em frascos agitados, empregando-se glicose e ácidos graxos contendo de 3 a 9 carbonos. A expressão dos genes *phaEC_{CV}* em *B. sacchari* PHA⁻ foi bem sucedida, uma vez que os mesmos foram capazes de reestabelecer a produção de PHA na mutante. Utilizando glicose, tanto a linhagem selvagem como o recombinante de *Burkholderia sacchari* produziram um PHA composto de monômeros de 3-hidroxi butirato (3HB). A partir de hexanoato e glicose obteve-se um copolímero no qual foi possível aumentar a fração de 3HHx de 0,30 mol% na linhagem selvagem para 1,85 mol%, na linhagem mutante. *Pseudomonas putida* abrigando *phaEC_{CV}* produziu um PHA no qual foi observado um aumento na fração de 3HHx de 0 para 9,11 mol% quando glicose foi fornecida como fonte de carbono. Essas linhagens poderão ser empregadas na produção de PHA com composição variada, controlando-se a incorporação de

frações 3HHx o que deve refletir nas suas propriedades, ampliando suas possibilidades de aplicação.

Palavras-chave: PHA. Metagenômica. Pseudomonas. Burkholderia. PHA sintase.

ABSTRACT

RAVELLI, T. G. **Selection of PHA synthases coding genes for the construction of recombinant *Burkholderia sacchari* and *Pseudomonas sp* and evaluation of polyhydroxyalkanoate production with different monomer compositions.** 2014. 109 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters accumulated by several bacteria from renewable sources that arouse great industrial interest because they are biodegradable and biocompatible thermoplastic. The variability of the PHA monomer composition determines its mechanical properties and allows their use in many applications. The PHAs may be formed by short-chain monomers (PHA_{SCL}) or medium (PHA_{MCL}), or even form polymers (PHA_{SCL} co-PHA_{MCL}) having intermediate properties. Three aspects are crucial for the production of PHA: the carbon source, the bacterial metabolic pathways and the PHA synthase enzyme. The PHA synthase catalyzes the polymerization of R-hydroxyacyl-CoA molecules forming biopolymer, and thus, the key enzyme in the biosynthesis of PHA. Four types of PHA synthases are known according to their substrate specificity and the peptide composition. Many studies have been undertaken to different compositions of the polymer. Thus, the aim of this paper was to search for genes encoding this enzyme, recombinant construction and assessment carrying such genes to find materials with new properties and applications. Initially we searched for new PHA synthase genes from 390 clones of a metagenomic library by PCR as previously detected positive for any type of PHA synthase. Later, two new sources of PHA synthase were sought: genes encoding PHA synthase III *Thiocapsa pfennigii* and *Allochromatium vinosum*. Out of 390 clones, only 2 showed positive for PHA synthase class II by PCR and sequencing reaction, showing similarity to known genes. Because of the fact that the type II PHA synthases has already been widely studied, unlike those of the type III, most promising for this work, coding genes were sought to test their integration in host able to accumulate high concentrations of PHA, but affected in its native PHA synthase (*Pseudomonas putida* and *Burkholderia sacchari*), evaluating the type of PHA produced. Thus, recombinant *Pseudomonas sp* and *B. sacchari* were built by the introduction of *T. pfennigii* genes (*phaEC_{TP}*) and *C. vinosum* (*phaEC_{CV}*) cloned into pBBR1-MCS2. The PHA production by recombinant obtained was qualitatively assessed by staining tests with Sudan Black B, indicated positive results only in *Burkholderia sacchari* harboring the gene *C. vinosum* being that *Pseudomonas putida* for housing *phaEC_{CV}* and *phaEC_{TP}* and *Burkholderia sacchari* *phaEC_{TP}* the result was negative. Quantitatively, PHA production was assessed in shake flask tests, using glucose and fatty acids containing from 3 to 9 carbons. The expression of genes in *B. sacchari* *phaEC_{CV}* PHA was successful, since they were able to restore the production of PHA in the mutant. Using glucose, both the wild type strain and the recombinant *Burkholderia sacchari* produced a PHA composed of monomers of 3-hydroxybutyrate (3HB). From hexanoate and glucose gave a copolymer in which the 3HHx was increased fraction of 0.30 mol% in the wild type strain to 1.85 mol% in the mutant strain. *Pseudomonas putida* harboring *phaEC_{CV}* produced a PHA in which there was an increase in 3HHx fraction from 0 to 9.11 mol% when glucose was supplied as a carbon source. These lines can be used to produce PHA with varied composition, controlling the incorporation of 3HHx fractions which should reflect on their properties, expanding its application possibilities.

Keywords: PHA. Metagenomics. *Pseudomonas*. *Burkholderia*. PHA synthase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Célula bacteriana contendo grânulos intracelulares de PHA (fotomicrografia eletrônica)..	24
Figura 2-Fórmula genérica de monômeros detectados em PHA. R: radical; n: número de átomos de carbono.	25
Figura 3-Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA .	26
Figura 4-Classes de PHA sintases.....	27
Figura 5-Organização genética de diversos locus de pha e exemplos de espécies de bactérias apresentando cada organização	29
Figura 6- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o resultado da extração plasmidial dos clones A8,A4,E2,F5,B9,D6,F6,E6,G8,D5,C2 E A6 da placa 23. A seta indica a presença dos plasmídeos, próximo ao tamanho de 20.000 pb.....	49
Figura 7-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) mostrando a amplificação obtida na reação de PCR pelo primer phaCF1/CR4 na presença de pJM9131(1) e pBHR71 (8) e a ausência de fragmentos quando DNA de <i>B.megaterium</i> foi utilizado como molde (9).A caneleta 2 mostra a amplificação obtida com os primers I-179L (a)/I-179R(a), tendo pBHR71 como molde.Esses primers também foram utilizados nas reações presentes na canaletas 4 e 7, contendo como molde pJM9131 e <i>B. megaterium</i> respectivamente. Os primers B1F/B1R foram utilizados nas reações das canaletas 3,5 e 6, tendo como DNA molde <i>B.megaterium</i> , pJM9131,e pBHR71 respectivamente.	51
Figura 8-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima, com o par de primer 179L (a)/I-179R(a).....	52
Figura 9-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer 179L (a)/I-179R(a).....	52

Figura 10-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.	53
Figura 11-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.	53
Figura 12-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4 para a classe I e 179L (a)/I-179R(a) para a classe II.	54
Figura 13-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.As setas vermelhas indicam os amplicons que foram enviados para o sequenciamento.	55
Figura 14-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de phaCF1/phaCR4 para a classe I e BIF/BIR para a classe IV.....	55
Figura 15- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a).....	56
Figura 16- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.	56
Figura 17-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.	57
Figura 18-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.	57
Figura 19-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.	58
Figura 20- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.	58

Figura 21-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a).....	59
Figura 22-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a). As setas vermelhas, indicam os amplicons que foram enviados para o sequenciamento.	59
Figura 23-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a) para classe II e BIF/BIR para classe IV.....	60
Figura 24-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer P1/P2 para as canaletas 1 e 4, phaC3F/phaC3F para as canaletas 2 e 6 e Haphapcr1/ Haphapcr2 para as canaletas 3 e 5. Todos esses primers são utilizados para a detecção de phaC de classe III. As setas vermelhas indicam os amplicons que foram enviados para sequenciamento	60
Figura 25-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaC3F/phaC3F.....	61
Figura 26-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaC3F/phaC3F.....	61
Figura 27-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaC3F/phaC3F.....	62
Figura 28-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR do plasmídeo do clone P34H3, utilizando-se o par de primer.....	69
Figura 29-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR do plasmídeo do clone P34E10, utilizando-se o par de primer I-179R(a)/Sp6 e I-179L (a)/T7. A sequência dos primers Sp6 e T7 está presente no vetor pBAC/oriV.....	72

Figura 30- Eletroforese em gel de agarose 0,8%, resultante da PCR das cianobactérias <i>Spirulina</i> sp e <i>Synechococcus</i> sp utilizando os pares de primer P1/P2, Haphapcr1/2,phaE3R/F e phaC3R/F.O controle positivo nesse caso é plasmídeo pBluescript SK::B28+.....	76
Figura 31- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) da reação de pcr das colônias TGR1, TGR2, TGR3 e pds37, com os primers P1/P2, Haphapcr1/2,phaE3R/F e phaC3R/F..	78
Figura 32- Perfil eletroforético dos fragmentos resultantes da digestão do plasmidio pds37::phaCE.1-pds37 sem digerir, 2- Digestão simples com PvuI e 3- Digestão dupla com EcoRI e PvuI.....	79
Figura 33-Perfil eletroforético dos amplicons resultantes de uma reação de PCR com diferentes temperaturas de anelamento. 1- 60°C, 2-62,8°C, 3- 65.5°C e 4 -68°C.....	80
Figura 34-Perfil eletroforético resultante da amplificação do gene phaCE das colônias de <i>B. sacchari</i> 344 resultantes da eletroporação. Cada canaleta corresponde a um clone diferente.	81
Figura 35-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), da digestão de pBluescript SK::B28+ com BamHI. A seta vermelha indica o inserto de 2.850 pb contendo PHAC e PHAE de <i>Thiocapsa pfennigii</i>	82
Figura 36-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), da digestão de pBBR2 com BamHI.....	83
Figura 37-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação do gene phaC de <i>B. sacchari</i>	84
Figura 38-Avaliação da capacidade de acúmulo de polímero pelos recombinantes, em colônias coradas por Sudan Black B.	85
Figura 39-Avaliação da capacidade de acúmulo de polímero pelos recombinantes, em colônias coradas por Sudan Black B.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre as propriedades físicas e térmicas de diferentes polímeros. ...	30
Tabela 2-Bactérias e plasmídeos utilizados no trabalho.	34
Tabela 3-Composição do meio LBAC.....	37
Tabela 4-Composição do meio F2	37
Tabela 5-Composição da solução de elemento traço contido no meio F2.....	38
Tabela 6-Composição da solução de vitaminas contida no meio F2	38
Tabela 7-Oligonucleotídeos empregados na confirmação da presença dos genes phaC.	40
Tabela 8-Sequência dos primers que flanqueiam phaCE de <i>Allochromatium vinosum</i> , <i>Thiocapsa pfennigii</i> e <i>Burkholderia sacchari</i> respectivamente.....	45
Tabela 9-Condições de PCR do primer PFEcoRI phaCE/ PRXhoI phaCE.....	45
Tabela 10-Condições de PCR do primer phaCBSF/ phaCBSR.....	45
Tabela 11-Relação dos clones que não apresentaram viabilidade durante a recuperação da biblioteca metagenômica	48
Tabela 12-Avaliação da capacidade de produção de PHA por recombinantes de <i>B. sacchari</i> abrigando genes codificadores de PHA sintase do tipo III, a partir de glicose (10g/L) como única fonte de carbono	88
Tabela 13-Avaliação da capacidade de produção de PHA por <i>B. sacchari</i> LFM 101 abrigando o plasmídeo pBBR1-MS2, a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).	89

Tabela 14-Avaliação da capacidade de produção de PHA por *B. sacchari* LFM 344 abrigando o gene *phaC* de *B. sacchari* , a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).90

Tabela 15-Avaliação da capacidade de produção de PHA por *B. sacchari* LFM 344 abrigando o gene *phaC* de *Allochromatium vinosum* , a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).91

Tabela 16-Avaliação da capacidade de produção de PHA por recombinantes de *Pseudomonas putida* abrigando genes codificadores de PHA sintase do tipo III, a partir de glicose (10g/L) como única fonte de carbono.....92

Tabela 17-Análise da concentração de ácidos orgânicos nas diferentes linhagens, com 24 e 72 horas de cultivo93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – 3-hidroxibutirato

3HD – 3-hidroxi-decanoato.

3HDD – 3-hidroxi-dodecanoato

3HHp – hidroxi-heptanoato

3HHx – 3-hidroxi-hexanoato

3HHx – 3-hidroxi-hexanoato

3HO – 3-hidroxi-octanoato

3HV – 3-hidroxi-valerato

3MA_{SCL} – 3-malonil-CoA de cadeia curta (4 carbonos)

4HB – 4-hidroxibutirato

AcCoA – acetil-CoA

Amp^S – sensibilidade à ampicilina;

CG – cromatografia gasosa

CoA – acetil-Coenzima A

CoA – coenzima A

HA – hidroxiacil-CoA.

HA_{LCL} – hidroxiacil-CoA de cadeia longa (mais de 14 carbonos) (do inglês *Long Chain Length*)

HA_{MCL} – hidroxiacil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *Medium Chain Length*)

HA_{SCL} – hidroxiacil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *Short Chain Length*)

HPLC - cromatografia líquida, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IPTG - isopropil-tio-β-D- galactosídeo

Km^R – resistência à canamicina;

Km^S – sensibilidade à canamicina;

LB - Luria Bertani

MM - meio mineral

MSC -massa seca celular

P(3HB) - poli-3-hidroxibutirato

P(3HB-*co*-3HA) - poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxiálcanoato).

P(3HB-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato)

P(3HB-*co*-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)

P(3HHx) – poli(3-hidroxihexanoato).

P(3HHx-*co*-3HO) – poli(3- hidroxihexanoato -*co*-3-hidroxióctanoato)

PCR – reação de polimerização em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PHA⁻ – ausência de acúmulo de PHA;

PHA – polihidroxiálcanoato

PHA⁺ – acúmulo de PHA;

phaA – gene codificador da enzima β -cetotilase

PhaA – β -cetotilase

phaB – gene codificador da enzima acetoacetil-CoA redutase

PhaB –acetoacetil–CoA redutase NADPH dependente

phaC – gene codificador da enzima PHA sintase ou polimerase

PhaC – PHA sintase ou polimerase

PhaE – subunidade da enzima PHA sintase de classe III

PHA_{MCL} – polihidroxiálcanoato com monômeros de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *medium chain length*)

PhaR – subunidade da enzima PHA sintase de classe IV

PHA_{SCL} – polihidroxiálcanoato com monômeros de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *short chain length*)

PhaZ – enzimas despolimerizadoras de PHA (despolimerases)

Tc^R – resistência à tetraciclina.

Tc^S – sensibilidade à tetraciclina;

T_m – temperatura de fusão

XGal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D- galactosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Polihidroxicarboxilatos (PHA)	24
2.2	PHA sintases	26
2.3	Biossíntese de PHA e suas diferentes composições	29
2.4	Seleção em biblioteca metagenômica por genes codificadores de PHA sintases	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Microrganismos, plasmídios e preservação	34
4.2	Condições de cultivo	36
4.3	Meios de cultura	37
4.4	Recuperação dos clones da biblioteca metagenômica	38
4.5	Manipulação do DNA	39
4.5.1	<i>Extração plasmidial</i>	39
4.5.2	<i>Quantificação dos plasmídeos</i>	39
4.5.3	<i>Confirmação dos clones positivos</i>	39
4.5.4	<i>Digestão dos clones com enzimas de restrição</i>	41
4.5.5	<i>Visualização do DNA</i>	41
4.5.6	<i>Eletroporação</i>	42
4.5.7	<i>PCR de colônia</i>	42
4.5.8	<i>Purificação dos produtos de PCR obtidos</i>	43
4.5.9	<i>Reações de sequenciamento</i>	43
4.5.10	<i>Análise das sequências</i>	43
4.6	Construção dos recombinantes	44
4.7	Avaliação da capacidade dos recombinantes no acúmulo de PHA	46
4.7.1	<i>Teor e composição do polímero</i>	46
4.7.2	<i>Massa seca celular (MSC)</i>	47
4.8	Determinação da concentração de ácidos orgânicos	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1 Viabilidade dos clones	48
5.2 Avaliação dos clones positivos	48
5.2.1 Extração plasmidial	48
5.3 Experimento controle da amplificação	49
5.4 Sequenciamento de fragmentos de DNA dos clones positivos	65
5.5 Amplificação e sequenciamento do inserto dos clones Classe II positivos	68
5.6 Detecção da presença do gene phaC em Spirulina sp e Synechococcus sp.....	75
5.7 Confirmação da presença do gene phaC no plasmídeo pBluescript SK- ::B28+.....	77
5.8 Construção de recombinantes.....	78
5.9 Construção do pBBR1MCS-2 abrigando phaCE de Allochromatium vinosum.....	78
5.9.1 Construção do pBBR1MCS-2 abrigando phaCE de Thiocapsa pfennigii	81
5.9.2 Construção do pBBR1MCS-2 abrigando phaC de Burkholderia sacchari....	83
5.10 Avaliação da produção de PHA pelos recombinantes	84
5.10.1 Avaliação qualitativa da produção de PHA em meio mineral sólido	84
5.10.2 Avaliação quantitativa da produção de PHA em meio mineral líquido	87
6 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE – Resultados de sequenciamento	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os plásticos têm grande influência na sociedade moderna e estão presentes na vida das pessoas com diversas aplicações, sendo uma delas a substituição de matérias-primas convencionais como metais, vidros, papéis e madeira. Há também sua aplicação na manufatura de embalagens e outros produtos por causa de sua praticidade e descartabilidade rápida. Entre os diversos polímeros de uso na sociedade atual, os plásticos sintéticos têm sido os mais utilizados (PEREIRA, 2002, 2007).

No entanto, devido a sua lenta degradabilidade e ao descarte volumoso dos plásticos sintéticos é cada vez maior a preocupação com os impactos ambientais e as conseqüências à saúde e à vida na Terra. Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis têm sido propostas para substituir os plásticos convencionais (SILVA et al., 2007).

Dentre os substitutos em desenvolvimento encontram-se os polímeros de amido modificado (combinado com polipropileno, polietileno, poliestireno, etc.), poli- ϵ -caprolactona (PCL), copoliésteres de acetato de celulose, álcool polivinílico (PVOH) e polihidroxialcanoatos – PHA (PEREIRA, 2002; PRADELLA, 2006).

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias a partir de fontes renováveis que despertam grande interesse industrial por serem termoplásticos, biodegradáveis e biocompatíveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso em diversas aplicações. Os PHA podem ser formados por monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}) ou média (PHA_{MCL}), ou ainda, formar copolímeros (PHA_{SCL}-PHA_{MCL}) que têm propriedades intermediárias (ANDERSON; DAWES, 1990; GOMEZ, 2000b; STEINBÜCHEL, 1993).

A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, sendo responsável pela catálise da polimerização das moléculas *R*-hidroxiacil-CoA formando o biopolímero. Entretanto sua especificidade e limitações metabólicas dos organismos produtores restringem a composição monomérica do PHA produzido e conseqüentemente das suas propriedades e aplicações (REHM, 2003).

A expressão de genes codificadores de PHA sintase em hospedeiros heterólogos tem levado à produção de PHA com novas propriedades (BOCANEGRA et al., 2013; SCHONEBAUM; STEINBÜCHEL, 1996; VALENTIN et al., 1994). Nesse aspecto, é importante estudar as bibliotecas metagenômicas que além de fornecerem dados importantes sobre as características populacionais microbianas (RODRIGO et al., 2006) são também uma

importante fonte de novos genes, principalmente provenientes de organismos não cultiváveis (ATLAS; BARTHA, 1997; GILLESPIE et al., 2002; LEFEVRE et al., 2008). Além disso, também é possível buscar organismos produtores de PHA como fonte de genes para expressão heteróloga.

Neste contexto, esse trabalho buscará diferentes genes para a expressão heteróloga em organismos produtores já conhecidos e avaliará se novos genes ou PHA com diferentes propriedades podem ser encontrados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polihidroxialcanoatos (PHA)

Os PHA são poliésteres acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares (Figura 1) que atuam como reserva de energia e equivalentes redutores na ausência de fonte de carbono externa. (SUDESH et al., 2000; REHM, 2003). A síntese de PHA normalmente ocorre de modo mais expressivo quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe, etc.)(GOMEZ, 2000b; SIMON-COLIN et al., 2008). Por outro lado, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, os PHA podem ser reutilizados para suprir essa necessidade (ANDERSON; DAWES, 1990; LEE et al., 1996).

Figura 1-Célula bacteriana contendo grânulos intracelulares de PHA (fotomicrografia eletrônica).(Retirado do Link: http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703maplesap_e.html).

As propriedades do PHA permitem que sejam utilizados como plásticos biodegradáveis, substituindo os convencionais, de origem petroquímica, em algumas aplicações, tais como, o uso em embalagens, filmes de recobrimento, aparatos médicos, aditivos para tintas e adesivos. As propriedades do polímero, bem como suas aplicações, dependem de sua composição monomérica. Uma fórmula genérica deste material está apresentada na Figura 2 (GOMEZ, 2000b; PARK et al., 2001).

Atualmente, mais de 150 hidroxialcanoatos distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos nas mais variadas combinações, que incluem monômeros saturados e insaturados, ramificações, grupos funcionais na cadeia lateral (halogênios, aromáticos, etc.) ou ainda com o grupo hidroxila em diferentes posições (GODOY et al., 2003; NODA et al., 2005; REHM ; STEINBÜCHEL, 1999;STEINBUCHHEL; SILVA et al., 2007, VALENTIN, 1995; ZHENG et al., 2005;).

Figura 2-Fórmula genérica de monômeros detectados em PHA.

R: radical; **n:** número de átomos de carbono (Gomez, 2000b).

Os monômeros encontrados na composição de PHA são classificados em dois grandes grupos:

Monômeros de cadeia curta (HA_{SCL} – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal;

Monômeros de cadeia média (HA_{MCL} – “HydroxyAcids of Medium-Chain-Length”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal (Steinbuechel e Valentin, 1995; Gomez, 2000b; Simon-Colin *et al.*, 2008).

Enquanto o primeiro grupo apresenta propriedades termoplásticas (alongamento para ruptura menor que 5%), o segundo se apresenta como elastômero (alongamento para ruptura maior que 1000%). A composição monomérica e a massa molecular do PHA são responsáveis por suas propriedades físicas e mecânicas. Do ponto de vista industrial é interessante o controle da composição monomérica porque isto influencia nas propriedades do material (PHA) e em suas diferentes aplicações. Por exemplo, as propriedades de PHA permitem a obtenção desde materiais rígidos, como o P3HB, a materiais flexíveis, como PHA_{MCL}, podendo também se apresentar como materiais viscosos e aderentes, que é o caso dos

PHA_{SMCL} contendo uma grande fração de monômeros insaturados (GOMEZ, 2000b; STEINBÜCHEL; HEIN, 2001).

Os PHA_{SCL} são encontrados em bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos (STEINBÜCHEL, 1991), enquanto que os PHA_{MCL} só foram detectados em *Pseudomonas* do grupo I de homologia do RNA ribossomal 16s (*Pseudomonas sensu stricto*) (HUISMAN et al., 1989). Apenas recentemente foi demonstrada a possibilidade de síntese de PHA contendo HA_{SCL} e HA_{MCL} em uma mesma cadeia polimérica (ABE et al., 1994; GOMEZ, 2000b; GOMES, 2009; MATSUDA, 2009; MENDONÇA, 2009; LIEBERGESELL; REHM et al., 2000 ; STEINBÜCHEL, 1993; VALENTIN et al., 1994).

2.2 PHA sintases

Embora um grande número de monômeros diferentes já tenha sido detectado como constituintes de PHA, convém destacar que a síntese e incorporação destes monômeros depende do fornecimento de um substrato adequado, que possa ser convertido no hidroxiaxil-CoA desejado através das vias metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma PHA sintase capaz de incorporar ao poliéster sendo formado o hidroxiaxil-CoA gerado. A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, sendo responsável pela catálise da polimerização das moléculas de *R*-hidroxiaxil-CoA formando o biopolímero (Figura 3) (GOMEZ, 2000b).

Figura 3-Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA (GOMEZ, 2000b).

Tanto a especificidade das vias metabólicas geradoras do hidroxiaxil-CoA, como da PHA sintase, podem impedir a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou, ainda, restringir a quantidade de um determinado monômero que pode ser incorporada ao PHA (GOMEZ, 2000b; REHM, 2003).

Entre as estratégias mais comumente aplicadas para a produção de PHA com composição variada, a mais comum tem sido o fornecimento de fontes de carbono, carboidratos, resíduos industriais, ácidos graxos de cadeias longa ou curta, em geral diretamente relacionadas quimicamente ao polímero que se deseja produzir (BUFFONI, 2006; STEINBUCHER; VALENTIN, 1995; SILVA et al., 2004). Este procedimento limita a natureza química do monômero incorporado, tanto pela oferta limitada de substratos (hidroxiaxil-CoAs) à PHA sintase microbiana, como pela especificidade da mesma pelo substrato, além de incidir em maior custo na otimização do processo de produção industrial.

De acordo com a estrutura primária das sequências dos genes codificadores e da especificidade das PHA sintases pelo substrato, estas foram, recentemente, divididas em 4 classes, como mostra a figura 4 (REHM, 2003), que apresenta também as suas respectivas unidades características, espécies microbianas típicas e substrato preferencial.

Classe	Subunidades	Espécies	Substrato
I	~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA _{ACL} -CoA (~C3-C5) 4HA _{ACL} -CoA, 5HA _{ACL} -CoA, 3MA _{ACL} -CoA
II	~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{ACL} -CoA (~C3-C5)
III	~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochrocatium vinosum</i>	3HA _{ACL} -CoA (3HA _{ACL} -CoA [~C6-C8], 4HA _{ACL} -CoA, 5HA _{ACL} -CoA)
IV	~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{ACL} -CoA

Figura 4-Classes de PHA sintases (REHM, 2003), modificado

Associados aos genes codificadores da PHA sintase, são encontrados outros genes participantes na biossíntese de PHA, promovendo diferentes conteúdos monoméricos. Os

produtos destes outros genes estão envolvidos em etapas como a biossíntese dos monômeros fornecidos à PHA sintase (como é o caso dos genes *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR*), ou são componentes estruturais do grânulo de polímero (*phaP*) ou mobilizam os grânulos intracelulares (*phaZ*) (REHM, 2003; SPIEKERMANN et al., 1999; SOLAIMAN; ASHBY, 2005; VALENTIN et al., 1994). A Figura 5 apresenta a organização de genes próximos ao codificador da PHA sintase (*phaC*) em organismos portadores de diferentes classes desta enzima.

As PHA sintase de classe I é estruturalmente composta por uma subunidade PhaC enquanto as PHA sintases de classe II são compostas por duas subunidades PhaC1 e PhaC2. Além da diferença estrutural, ambas diferem na especificidade pelos substratos: PHA sintases da classe I, III e IV utilizam preferencialmente de cadeias curtas (*R*)-3-hidroxiacil-CoAs, enquanto a PHA sintase da classe II usa cadeias médias de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA. As PHA sintases de classe III e IV distinguem-se das de classe I e II, pois possuem duas subunidades distintas PhaC e PhaE, PhaC e PhaR (figura 5) respectivamente (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

No Brasil, a produção de alguns tipos de PHA vem sendo estudada, destacando-se o homopolímero P3HB – homopolímero poli-3-hidroxibutirato e o copolímero de poli-3-hidroxibutirato-*co*- 3- hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV), para gerar PHA mais maleáveis (SILVA et al., 2007). O interesse comercial por este polímero vem aumentando, no país graças à possibilidade de produzi-los a partir de fontes de carbono renováveis pela agricultura, como a sacarose, glicose, xilose e derivados do bagaço de cana-de-açúcar entre outros (HOLMES, 1985B; LOPES et al., 2009; LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2000). Leva-se em consideração neste caso, o fato de que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de açúcar, que o valor agregado de PHA é maior que o do álcool, além de poder se tornar num produto de exportação (BUENO NETO et al., 1991).

Figura 5-Organização genética de diversos loci envolvidos na produção de PHA e exemplos de espécies de bactérias apresentando cada organização (Solaiman e Ashby, 2005).

Os diversos trabalhos desenvolvidos no país até o momento focalizaram a busca, em fontes como o solo, por microrganismos produtores, PHA_{SCL} e PHA_{MCL} por meio de isolamento e cultivo de microrganismos ou melhoramento de linhagens pré-existent em coleções microbianas (GOMEZ, 2000b; SILVA et al., 2007). A busca foi direcionada a microrganismos capazes de crescer e acumular PHA em produtos da agricultura, resíduos industriais ou produtos químicos com potencial para gerar novos materiais (BUFFONI, 2006; MENDONÇA et al., submetido; SILVA et al., 2007). Neste aspecto, o potencial da biodiversidade brasileira tem oferecido grandes perspectivas de obtenção de microrganismos, ainda não descritos, que apresentam a capacidade metabólica tanto da utilização de substratos não usuais, como da sua transformação em PHA.

2.3 Biossíntese de PHA e suas diferentes composições

O P3HB é produzido a partir da ação conjunta de três enzimas: β -cetotiolase (PhaA), enzima acetoacetyl-CoA redutase (phaB) e pha sintase, como já dito anteriormente. A enzima β -cetotiolase (PhaA), codificada pelo gene *phaA* é responsável por condensar duas moléculas de acetyl-CoA para gerar acetoacetyl-CoA, o primeiro passo na síntese de P(3HB). A condensação da molécula de acetyl-CoA ocorre predominantemente após o período de crescimento bacteriano, mas não é inexistente nessa fase. A enzima acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) é codificada pelo gene *phaB* e catalisa a reação de redução de acetoacetyl-CoA a (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA. A PHA sintase é a enzima responsável pela polimerização das moléculas de *R*-hidroxiacetyl-CoA formando o biopolímero (BRAUNEGG, et al., 1998).

A copolimerização de 3HB com diferentes monômeros possibilita a obtenção de polímeros com diferentes propriedades, sendo possível a modificação de características como flexibilidade e temperatura de fusão (tabela 1). Dessa forma é possível que haja uma grande variabilidade na sua aplicação, podendo ser utilizados como embalagens, vasilhames e até mesmo produtos de uso médico e farmacêutico (fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas para liberação controlada de fármacos) (CHEN, 2009; PARK et al., 2012; PRADELLA, 2006).

Tabela 1- Comparação entre as propriedades físicas e térmicas de diferentes polímeros.

Polímero	T_m (°C)	T_g (°C)	Resistência à Tensão (MPa)	Alongamento para ruptura (%)
P(3HB)	177	4	43	5
P(3HB-co-10% HV)	150	-	25	20
P(3HB-co-20% HV)	135	-	20	100
P(3HB-co-3% 4HB)	166	-	28	45
P(3BH-co-10% 4HB)	159	-	24	242
P(3BH-co-64% 4HB)	50	-	17	591
P(3HB-co-5% HHx)	151	0	-	-
P(3HB-co-10% HHx)	127	-1	21	400
P(3HB-co-15% HHx)	115	0	23	760
P(3HB-co-17% HHx)	120	-2	20	850
P(3HB-co-19% HHx)	111	-4	-	-
P(3HB-co-25% HHx)	52	-4	-	-
PHO	61	-35	9	380
Polipropileno	170	-	34	400
Poliestireno	110	-	50	-
PET	262	-	56	730
HDPE	135	-	29	-
LDPE	130	-30	10	620

3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; HV: 3-hidroxivalerato; HHx: 3-hidroxihexanoato, HO: 3-hidroxioctanoato, PET – polietileno tereftalato, HDPE – polietileno de alta densidade, LDPE – polietileno de baixa densidade, T_m – temperatura de fusão; T_g temperatura de transição vítrea. Fontes: Holmes (1988); King (1982); Doi, Kitamura e Abe (1995); Sudesh, Abe e Doi (2000); Khanna; Srivastava (2005); Pradella (2006); Carminatti et al. (2006)

2.4 Seleção em biblioteca metagenômica por genes codificadores de PHA sintases

Apesar do potencial da biodiversidade do ambiente, os métodos tradicionais de isolamento e cultivo para análise da diversidade microbiana do meio ambiente são limitados,

pois poucos microrganismos são cultiváveis (ATLAS; BARTHA, 1997; PEREIRA, 2003). O uso recente de ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em seqüências gênicas vem sendo empregados com sucesso para análise da diversidade microbiana dos solos (BORNEMAN; TRIPLET, 1997; RODRIGO et al., 2006; TORSVIK et al., 1998), na clonagem de grandes fragmentos de DNA para isolamento de antibióticos de bibliotecas metagenômicas, assim como para estudar a fisiologia de microrganismos não cultiváveis em comunidades do solo (GILLESPIE et al., 2002; PEREIRA, 2003; LEFEVRE et al., 2008).

Metagenoma é uma técnica que analisa o conjunto de genomas encontrado na microbiota total de determinado habitat. Dessa forma, oferece uma alternativa para acessar mais amplamente a diversidade microbiana total de um determinado ambiente, permitindo a análise de genes funcionais e compostos bioativos em um número maior do que as técnicas tradicionais de cultivo permitem (LORENZ et al., 2002; LORENZ; ECK, 2005; PEREIRA, 2003).

Nesse contexto, alguns trabalhos já foram feitos, no sentido de buscar novos genes de PHA sintase em bibliotecas metagenômicas e as metodologias e técnicas utilizadas para o screening são bastante variáveis. Uma das técnicas utilizadas para o screening é a construção de macro arranjos a partir dos clones obtidos onde pôde-se buscar os genes de PHA sintase através de sondas. Há relato da utilização desse tipo de screening em solo e sedimentos coletados sob diversas condições (como contaminação por óleo), em que foram encontradas PHA sintases de classe I, II e III (DIMITROV, 2009).

Outra abordagem que pode ser utilizada e já foi descrita na literatura é a busca de clones positivos a partir do fenótipo. Nesse caso a biblioteca é construída em vetores, como cosmídeos, que são transferidos para uma bactéria mutante PHA negativa, com mutação no gene da PHA sintase. Quando o gene da PHA sintase está presente no vetor, o fenótipo da bactéria é restabelecido, e ela se torna capaz de produzir PHA comprovando a existência do gene na biblioteca. Utilizando essa metodologia obteve-se sucesso em encontrar novos tipos de PHA sintase (ANEJA et al., 2004; SCHALLMEY et al., 2011).

Em outro trabalho recentemente desenvolvido (GALINDO, 2011) buscou-se por genes codificadores de PHA sintases, empregando técnicas de PCR em uma biblioteca metagenômica construída a partir de solo de Mata Atlântica (MASSINI, 2004) e disponibilizada pelo Prof. Gabriel Padilla do ICB USP. Os testes funcionais não foram relevantes para auxiliar nesta seleção. Foi gerada uma pequena coleção de clones (cerca de 300 clones) promissores detectados por PCR. Aproximadamente 70 geraram amplicons a

partir de primers para classe III, entretanto, sequenciamento de alguns clones selecionados ao acaso indicou similaridade com genes codificadores de enzimas diferentes de PHA sintases.

O primeiro critério de seleção, focou analisar potenciais genes de classe III, visto que, embora detectadas em algumas bactérias, apenas poucas destas foram descritas e, entre estas poucas, uma, isolada de *Thiocapsa pfenigii*, já demonstrou especificidade por maior número de substratos e sua expressão em *Pseudomonas putida* revelou a produção de HA_{SCL} com HA_{MCL} (VALENTIN et al., 1996; LIEBERGESELL et al. , 2000; HAI et al., 2004). Poucos trabalhos empregaram tais genes para clonagem e expressão em hospedeiros PHA⁻ com diferentes arcabouços metabólicos para avaliar que PHA seriam gerados. A maioria emprega PHA sintases de classe I para obter tais materiais. Nosso grande interesse no momento são combinações de HA_{SCL} com HA_{MCL}, que apresentam propriedades intermediárias às de HA_{SCL} ou HA_{MCL} isoladamente. Apenas recentemente, em algumas bactérias halofílicas, PHA sintases relacionadas com classe I e III foram detectadas, propondo-se que estas últimas seriam um subgrupo da classe III, entretanto apenas a produção de PHB (HA_{SCL}) foi observada e nas próprias cepas selvagens (QUILLAGUAMÁN et al., 2010; POLI et al., 2011).

Outro dado importante, com relação às PHA sintases de classe IV (descritas em *Bacillus*) é que apenas recentemente foi reportada sua expressão na bactéria Gram negativa *Ralstonia eutropha*, mostrando que, dependendo da origem bacteriana da enzima, especificidades mais relaxadas podem ser observadas e também a formação do polímero alvo mencionado (HYAKUTAKE et al., 2011). Dentro desse contexto foi proposto o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Construir recombinantes em hospedeiros PHA negativos, abrigando PHA sintases heterólogas, avaliando se sua expressão em hospedeiros metabolicamente distintos leva à obtenção de PHA com composição monomérica distinta , que resultem em propriedades intermediárias às dos PHA já descritos.

3.2 Objetivos específicos

- Reavaliar os 390 clones positivos obtidos anteriormente;
- Selecionar os clones positivos mais promissores para clonagem em hospedeiros PHA negativos;
- Buscar organismos portadores de PHA sintases de classe III para a expressão heteróloga;
- Avaliar o PHA produzido pelos recombinantes

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1— Microrganismos, plasmídios e preservação

As linhagens, os plasmídios e os genes que foram utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. Poderão ser utilizados, ainda, outros microrganismos. A preservação foi feita por liofilização (SILVA et al., 1992) ou suspensão em glicerol (20% m/v) e estoque em freezer a - 80 °C.

Tabela 2-Bactérias e plasmídeos utilizados no trabalho.

Bactérias/Plasmídeos	Características	Referência
<i>Bacillus megaterium</i> M.A 3.3	Isolado bacteriano produtor de PHA.	(Lopes <i>et al.</i> , 2009)
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	Sac ⁺ , PHA ⁺ , Hx ⁺ , Kan ^s , Amp ^s , Tc ^s	(Bramer <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. sacchari</i> LFM936	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2 vazio	Este trabalho
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM344	Mutante UV de LFM 101, PHA ⁻ , afetado no gene <i>phaC</i> (PHA sintase)	(Filipov, 2000)
<i>B. sacchari</i> LFM1039	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2 vazio	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 046	Linhagem selvagem produtora de PHA _{MCL} isolada a partir de solo de canavial	(Gomez <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. coli</i> S17-1 436	Genes <i>recA</i> e <i>tra</i> do plasmídeo RP4 integrados ao cromossomo	(Simon, Priefer e Pühler, 1983)
<i>E. coli</i> S17-1 1223	<i>E. coli</i> S17-1 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Allochrodatum vinosum</i> (atualmente <i>Allochrodatum vinosum</i>) (<i>phaCE_{Cv}</i>)	Este trabalho
<i>E. coli</i> S17-1 1224	<i>E. coli</i> S17-1 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Thiocapsa pfennigii</i> (<i>phaCE_{Tp}</i>)	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 1213	<i>P. putida</i> LFM046 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS2 sem inserto	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 461	Mutante de LFM046deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose e octanoato (<i>phaC</i> ⁻)	(Galindo,2011)

<i>P. putida</i> LFM 1214	<i>P. putida</i> LFM0461 abrigando o plasmídio pBBR1MCS2 sem inserto	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 1215	<i>P. putida</i> LFM 461 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Allochromatium vinosum</i> (<i>phaCE_{CV}</i>)	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 1216	<i>P. putida</i> LFM 461 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Thiocapsa pfennigii</i> (<i>phaCE_{TP}</i>)	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1217	<i>B. sacchari</i> LFM344 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Allochromatium vinosum</i> (<i>phaCE_{CV}</i>)	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM 1218	<i>B. sacchari</i> LFM 344 abrigando pBBR1MCS2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Thiocapsa pfennigii</i> (<i>phaCE_{TP}</i>)	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1219	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ -	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10B LFM 1220	Linhagem hospedeira do plasmídeo pBAC/oriV contendo os fragmentos de interesse. F ⁻ , Stp ^R , PHA ⁻	(Galindo, 2011)
<i>E. coli</i> DH5 α LFM 1221	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR</i> 17 (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE</i> 44 λ - <i>thi</i> -1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 α LFM 1222	<i>E. coli</i> DH5 α abrigando plasmídeo pBluescript SK ⁻ ::B28+.PHA	Este trabalho
<i>Spirulina</i> sp	Cianobactéria	IOUSP*
<i>Synechococcus</i> sp	Cianobactéria	IOUSP*
pJM9131	Plasmídeo contendo os genes <i>phaCAB</i> de <i>Ralstonia eutropha</i> , Kan ^r , <i>lacZ</i> , PHA ⁺	(Kidwell, Valentin e Dennis, 1995)
pBHR71	Plasmídeo contendo o gene <i>phaC1</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Amp ^r , <i>lacZ</i> . PHA ⁻	(Langenbach, Rehm e Steinbüchel, 1997)
pBAC/oriV	oriV, <i>lacZ</i> α , <i>parA</i> , <i>parB</i> , <i>parC</i> , <i>repE</i> , Cm ^r	(Wild, Hradecna e Szybalski, 2002)
pBluescript SK ⁻ ::B28+	Plasmídeo contendo <i>phaEC</i> de <i>Thiocapsa pfennigii</i> . Amp ^r , <i>lacZ</i> . PHA ⁻	(Liebergessell, Rahalkar e Steinbüchel, 2000)

pds37	Plasmídeo contendo <i>phaEC</i> de <i>Cromathium vinosum</i>	(Liebergesell, Rahalkar e Steinbüchel, 2000)
pBBR1MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5,144 Kb), Km ^r .	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pBBR1MCS-2 :: <i>phaCE</i> _{Cv}	pBBR1MCS-2 :: <i>phaCE</i> _{Cv} - pBBR1MCS-2 contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Allochrodatum vinosum</i> (atualmente <i>Allochrodatum vinosum</i>) (<i>phaCE</i> _{Cv})	Este trabalho
pBBR1MCS-2 :: <i>phaCE</i> _{TP}	<i>pBBR1MCS-2 ::phaCE</i> _{TP} - <i>pBBR1MCS-2</i> abrigando <i>pBBR1MCS2</i> contendo os genes <i>phaCE</i> de <i>Thiocapsa pfennigii</i> (<i>phaCE</i> _{TP})	Este trabalho
pBBR1MCS-2 :: <i>phaC</i> _{BS}	pBBR1MCS-2 :: <i>phaC</i> _{BS} - pBBR1MCS-2 contendo os genes <i>phaC</i> de <i>Burkholderia sacchari</i>	Este trabalho

PHA⁺: acúmulo de polihidroxialcanoatos, PHA⁻: ausência de acúmulo do polímero, Kan^R: resistência à canamicina, Amp^r: Resistente à ampicilina, Cm^r: Resistência ao cloranfenicol. * Coleção de Microrganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico (IO-USP), coordenado pela Prof^a Dr^a Sônia M. F. Ganesella

4.2 Condições de cultivo

As culturas microbianas de *E. coli* contendo os diferentes plasmídeos, assim como de *Bacillus megaterium* M.A 3.3 foram cultivadas em meio líquido e/ou sólido de Luria Bertani, contendo os antibióticos e a arabinose quando necessários (SAMBROOK *et al.*, 1989). As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C, sob agitação de 150-200 rpm durante 20 horas e *Bacillus megaterium* M.A 3.3 foi cultivados a 30 °C, com agitação de 150-200 rpm durante 24 horas.

As culturas de *Spirulina sp* e *Synechococcus sp* foram cultivadas em meio F2 líquido (GUILLARD, 1962) a 18 °C durante 7 dias.

4.3 Meios de cultura

Meio Luria Bertani - LB (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989)

Componente	Concentração
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
Cloreto de Sódio	10g/L

Para obtenção do meio sólido, foram adicionados de 15- 20 g/L de ágar.

Quando necessário, adicionou-se ampicilina 0,1g/L

Meio Luria Bertani com adição de Arabinose e Cloranfenicol – LBAC (Wild, Hradecna e Szybalski, 2002)

Tabela 3-Composição do meio LBAC

Componente	Concentração
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
Cloreto de Sódio	10g/L
Arabinose	2g/L
Cloranfenicol	0,0125 g/L

Para obtenção do meio sólido, foram adicionados de 15- 20 g/L de ágar.

Meio F2

Tabela 4-Composição do meio F2

Componente	Solução Stock	Quantidade	Concentração final
NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g/L dH ₂ O	1 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30 g/L dH ₂ O	1 mL	1.06 x 10 ⁻⁴ M
Elementos (metal)	traço	1 mL	---
Solução de vitaminas		0.5 mL	---

Elemento traço (metal)

Tabela 5-Composição da solução de elemento traço contido no meio F2

Componente	Solução de estoque	Quantidade	Concentração final
FeCl ₃ 6H ₂ O	---	3.15 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	---	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL	3.93 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL	2.60 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M

Solução de vitaminas

Tabela 6-Composição da solução de vitaminas contida no meio F2

Componente	Solução stock	Quantidade	Concentração final
tiamina HCl (vit. B ₁)	---	200 mg	2.96 x 10 ⁻⁷ M
biotina (vit. H)	0.1 g/L dH ₂ O	10 mL	2.05 x 10 ⁻⁹ M
cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL	10 ⁻¹⁰ M

4.4 Recuperação dos clones da biblioteca metagenômica

A biblioteca metagenômica foi construída (MASSINI, 2004) a partir da obtenção do DNA total de amostras de solo de Mata e posterior digestão com a enzima *Hind*III. Após a otimização das condições de digestão, o DNA foi ligado com o vetor pBAC/oriV (~8kb). O resultado da ligação foi inserido por transformação química, em células receptoras *E. coli* DH10B e semeadas em meio LBAC e incubado a 37°C, gerando cerca de 5000 clones. As células transformantes foram transferidas para meio de cultura líquido em placas de polipropileno de 96 poços (Placas de ELISA) e crescidas em 150 µl de meio LBAC, a 37 °C por 16 horas e em seguida foram adicionados 50 µl de glicerol a 60 % em cada poço para preservação das células, sendo finalmente acondicionadas à temperatura de -80 °C.

Desses 5000 clones, foram obtidos um total de 390 que foram positivos para algum dos quatro tipos de PHA sintase, detectada por PCR (GALINDO, 2011). Os 390 clones positivos da biblioteca metagenômica foram previamente removidos do freezer -80 °C e descongelados em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos antes de serem recuperados

em novo meio. Novas placas de polipropileno de 96 poços foram preenchidas com 150 µl de meio LBAC. Para transferir as culturas para novo meio, foi utilizado um carimbo de 96 dentes metálicos, previamente esterilizado em autoclave e sendo flambado após 2 minutos em álcool. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 37 °C durante 16 horas. Após este período, foi avaliado o crescimento dos clones em cada uma das placas e foram feitas duas novas cópias, às quais após o período de cultivo foram adicionados 50 µl de glicerol ao 60 % a cada um dos poços para a preservação das células, sendo acondicionadas à temperatura de -80 °C.

4.5 Manipulação do DNA

4.5.1 Extração plasmidial

Após a confirmação do crescimento dos clones, os mesmos foram inoculados separadamente em erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio LBAC líquido e foram mantidos a 37 °C durante 18 horas. A extração plasmidial foi feita com o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), São Paulo, SP, Brasil, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.2 Quantificação dos plasmídeos

Após a extração plasmidial, as amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000.

4.5.3 Confirmação dos clones positivos

Os clones positivos obtidos anteriormente (GALINDO, 2011) foram testados novamente por PCR e os oligonucleotídeos utilizados na reação, estão listados na tabela 6. As reações de PCR, foram realizadas utilizando-se os plasmídeos como DNA molde. Todos os oligos foram testados para todos os microrganismos controle, para detectar possíveis pareamentos de mais de um iniciador para um mesmo microrganismo controle. Os testes foram realizados com o material genético dos plasmídeos pJM9131, pBHR71 e *Bacillus megaterium*. M.A. 3.3.

Tabela 7-Oligonucleotídeos empregados na confirmação da presença dos genes *phaC*.

Nome	Sequência 5' → 3'	Classe PHA sintase	Tamanho amplicon	Referência
phaCF1	ATCAACAARTWCTACRTCYTSGACCT	I	~496 pb	(Sheu, Wang e Lee, 2000)
phaCR4	AGGTAGTTGTYGACSMRTAGKTCCA			
I-179L(a)	ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGAN	II	~540 pb	(Solaiman, Ashby e Foglia, 2000; Solaiman, 2002)
I-179R(a)	GGTGTGTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATG TN			
Haphapcr1	GTTTTAATCGATTACGCNYTNGTNAAYM GNCCNTAYATG	III	~600 pb	(Hai, Hein e Steinbüchel, 2001)
Haphapcr2	CGGGACTATRAADATCCAYTTYTCCATN CKTAGAAAGTT			
P1	ATNGAYTGGGGNTAYCCN	III	~536 pb	(Hai <i>et</i> <i>al.</i> , 2004)
P2	RAADATCCAYTTYTCCAT			
phaC3F	GTYTACGCCCTGGTVAAAYC	III	~574 pb	(Galindo Rozo, 2011)
phaC3R	KGAAYTGRCGGWARGTYTCS			
phaE3F	GCVRASMCYKTSGCCWAMAY	III	~563 pb	(Galindo Rozo, 2011)
phaE3R	YCMDKRCDYYSAGRTRTTYTYK			
B1F	AACTCCTGGGCTTGAAGACA	IV	~590 pb	(Shamala <i>et</i> <i>al.</i> , 2003)
B1R	TCGCAATATGATCACGGCTA			

Fonte : (Galindo Rozo, 2011) Modificado

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, marca Eppendorf), adotando as seguintes condições:

Para um volume de 5µL de reação:

PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)*	3,0 µL
Iniciador <i>foward</i> (10 µM)	0,5 µL
Iniciador <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µL
DNA (< 250 ng/ µL)	0,5 µL
Água livre de nuclease	0,25 µL
Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)	0.25 µL

* 50U/mL Taq DNA polimerase, 400 μ M de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3mM de MgCl₂

As reações de amplificação dos oligos para classe I,II e IV foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 3 minutos, este ciclo foi repetido 35 vezes e incubação final a 4 °C. A reação dos oligos para a classe III foi feita nas mesmas condições, mas com o anelamento a 52,2°C.

4.5.4 Digestão dos clones com enzimas de restrição

Os DNAs plasmidiais previamente extraídos foram digeridos com enzimas de restrição do tipo *FastDigest*® (Fermentas Life Sciences), com volume final de 20 μ L. As reações de digestão ocorreram de acordo com as orientações do fabricante, seguindo as concentrações, temperatura e tempo de incubação, específicos de cada enzima.

4.5.5 Visualização do DNA

Para visualização e análise do DNA provenientes de digestões, extrações e produtos de PCR foram realizadas corridas eletroforéticas em géis de agarose elaborados na concentração de 0,8% (m/v). A solução TAE foi utilizada para dissolver a agarose, bem como o tampão de corrida (SAMBROOK et al., 1989)

Solução TAE

Tris-base (hidroximetil aminometano)	242g
Ácido acético glacial	57,1mL
EDTA de cálcio e sódio 0,5M	100 mL
H ₂ O q.s.p	1000 mL

A agarose dissolvida em TAE foi levada ao micro ondas por 1 minuto e em seguida adicionou-se *SYBR*® *Safe* na proporção de 1 μ L de SYBR para 10mL de agarose diluída em TAE. Após a solidificação do gel, as amostras de DNA foram aplicadas e estes submetidos a corridas eletroforéticas de 60-120V, 80mA, 80W por 1 hora. Ao final da corrida eletroforética, os fragmentos de DNA puderam ser observados sob luz UV (254nm) em transiluminador (Multidoc-It Digital Imaging system UV transilluminator, USA). Foi

aplicado no primeiro poço da canaleta do gel, o marcador de tamanho de fragmento de DNA 1kb plus fermentas para orientação na seleção dos fragmentos obtidos.

4.5.6 Eletroporação

Células eletrocompetentes da linhagem *E. coli* DH5 α foram preparadas conforme descrito por Ausubel, 1992 (AUSUBEL et al., 1992). Inoculou-se uma colônia da bactéria em meio LB líquido durante 16 horas a 37 °C em agitador rotativo. Após a incubação, a densidade ótica (D.O.610nm) foi determinada e um volume adequado de meio LB foi adicionado ao cultivo, de modo a se obter D.O.610nm inicial de 0,1 unidades de absorbância e 500 mL de cultura final. O cultivo foi então incubado a 37 °C em agitador rotativo e medições de D.O. foram realizadas, até atingir D.O.610 nm = 0,5.

Atingida a D.O. adequada, transferiu-se a cultura para tubos de centrifuga pré-resfriados, mantida em banho de gelo (15 min), e centrifugadas (15 min, 8000 rpm, 4 °C). Descartando o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 mL de água milli-Q estéril e gelada, e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Esse procedimento foi repetido duas vezes e na terceira repetição, a água milli-Q estéril foi substituída por glicerol 10%. O sobrenadante foi mais uma vez desprezado e as células foram ressuspensas em 1,0 mL de glicerol 10% gelado, distribuídas em alíquotas de 40 μ L e conservadas em freezer -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes foi adicionado 1 μ L do plasmídeo de interesse, à alíquota de células eletrocompentes. A mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm, previamente resfriadas. As células foram submetidas a pulsos de 2500 V, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω para a eletroporação. Adicionou-se 1,0 mL de meio LB às células, que foram incubadas a 37 °C. Posteriormente, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo o ampicilina e incubadas a 37 °C, por 24 horas

4.5.7 PCR de colônia

A PCR de colônia foi utilizado com duas finalidades: para selecionar os clones resultantes da eletroporação que, e para avaliar se as cianobactérias *Spirulina* sp e *Synechococcus* sp possuíam o gene *phaC*. Em ambos os casos, utilizou-se os oligos que amplificam *phaC* de classe III.

Primeiramente, as colônias isoladas são colocadas em microtubos contendo 150 µL de água livre de nuclease, previamente esterilizada em autoclave, com o auxílio de ponteiras ou palitos estéreis. A mistura foi mantida por 10 minutos a 95°C (Pandey *et al.*, 2007). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 13000 rpm e em seguida levadas ao freezer, onde ficavam pelo menos por 4 horas, antes da utilização. Para fazer a reação do PCR, 2µL do sobrenadante foram adicionados à reação, como listado abaixo:

Para um volume de 10µL de reação:

PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)*	6,0 µL
Iniciador <i>foward</i> (10 µM)	1,0 µL
Iniciador <i>reverse</i> (10 µM)	1,0 µL
DNA(sobrenadante)	2,0 µL

4.5.8 *Purificação dos produtos de PCR obtidos*

Para o isolamento e a purificação do produto de interesse de cada reação de PCR após a separação e visualização dos fragmentos por corrida eletroforética em gel de agarose, foram utilizados dois tipos de kits dependendo da presença de bandas inespecíficas. Para o isolamento a partir do gel de agarose, quando havia presença de bandas inespecíficas, foi utilizado o QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, USA) e para os produtos de PCR que só apresentavam o amplicon de interesse foi utilizado o QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, USA), conforme instruções dos fabricantes.

4.5.9 *Reações de sequenciamento*

Após a purificação dos fragmentos amplificados, estes foram utilizados para a reação de sequenciamento no **Centro de Estudos do Genoma Humano - USP**, com o **ABI 3730 DNA Analyser** (Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit**.

4.5.10 *Análise das sequências*

As sequências consenso foram obtidas pelo software Pregapep e GAP oferecidos pelo programa Staden Package (BONFIELD; STADEN, 1996) e posteriormente analisadas

empregando a ferramenta blastn encontrada no programa do **National Center for Biotechnology Information** (NCBI), buscando o resultado de alinhamento com o gene *phaC* das diferentes classes.

4.6 Construção dos recombinantes

Nesta etapa foram feitos experimentos para expressar os genes *phaCE* de *Allochrodatum vinosum* presente no plasmídeo pds37, de *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii* abrigado no plasmídeo pBluescript SK⁻::B28+ e *phaC* de *Burkholderia sacchari*, em uma linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 344 (FILIPOV, 2000) e *Pseudomonas* sp. LFM 461(GOMEZ, 2000a), ambas PHA negativas.

Para clonagem de *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii*, o plasmídeo pBluescript SK⁻::B28+ e foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI para a remoção do inserto. Além disso, foram sintetizados um par de primers com o intuito de amplificar o gene a ser clonado (tabela 7). O inserto removido foi ligado, utilizando-se a enzima T4 ligase, em um plasmídeo pBBR2MCS-1 previamente digerido com *Bam*HI. Os plasmídeos com inserto foram inseridos por eletroporação para *E. coli* DH10B, e as colônias foram selecionadas por alfa-complementação. Após a seleção das colônias, os plasmídeos foram extraídos como descrito no item 5.5.1. e inseridos por eletroporação nas linhagens LFM 461 e LFM 344.

Para a clonagem dos genes *phaCE* de *Allochrodatum vinosum* também utilizaram-se dois procedimentos distintos: a digestão do plasmídeo pds37 com as enzimas *Eco*RI e *Pvu*I para a remoção do inserto e a síntese de primers que flanqueiam o gene (tabela 7). O primer foi testado em diversas temperaturas de anelamento para a padronização da reação de PCR. Após a obtenção da amplificação do gene com a utilização dos primers desenhados, o amplicon obtido através da reação de PCR (tabela 8) foi sequenciado e após a confirmação da sequência o mesmo foi digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Eco*RI, purificado e ligado, utilizando uma enzima T4 ligase, em um pBBR2MCS-1 previamente digerido com *Xho*I e *Eco*RI. O plasmídeo com o inserto foi inserido por eletroporação em células eletrocompetentes de *E.coli* DH10B e as células foram selecionadas por alfa complementação. Para a confirmação dos clones recombinantes, realizou-se um PCR de colônia utilizando-se os primers descritos acima.

Já na clonagem do gene *phaC* de *Burkholderia sacchari* foi sintetizado um primer que flanqueia o gene *phaC*, para que o gene a ser clonado fosse amplificado em sua totalidade

Tabela 8-Sequência dos primers que flanqueiam *phaCE* de *Allochrodatum vinosum*, *Thiocapsa pfennigii* e *Burkholderia sacchari* respectivamente

Nome	Sequência 5' → 3'	Tamanho amplicon	Referência
PF <i>EcoRI</i>	CGGCCGGAATTCATCCAGGGCCACTATCTCCAAC	~3000 pb	Presente
<i>phaCE</i>	GTACCTCTCGAGTCCTCTGGATTCTGATTGG		trabalho
PRX <i>hoI</i>			Presente
<i>phaCE</i>			trabalho
phaECThioA	ACTCATGGGCCCTCGAGGACGCCTCGCGAAGGCT	~2600pb	Presente
paPF	CTAG		trabalho
phaECThioEc	CTAGTTGAATTCTCAGCCGCGTTCGTTTCAGCCAG		Presente
oPR	C		trabalho
phaCBSF	GTAAGTGGATCCGTACTTCATGCGATTCAAATCA	~2000pb	Presente
	G		trabalho
phaCBSR	CGAATTGAGCTCCACGTTAAAAACCTTTCACC		

Tabela 9-Condições de PCR do primer PF*EcoRI* *phaCE*/ PRX*hoI* *phaCE*

Etapa	Temperatura	Tempo
Temperatura de Lid	104°C	-
Ativação da enzima	95°	5 minutos
Desnaturação	94°	15 segundos
Anelamento	68.1°C	1 minuto
Extensão	68°C	6 minutos
Extensão Final	72°C	10 minutos
Hold	4°C	-

Tabela 10-Condições de PCR do primer phaCBSF/ phaCBSR

Etapa	Temperatura	Tempo
Temperatura de Lid	104°C	-
Ativação da enzima	95°	5 minutos
Desnaturação	94°	15 segundos
Anelamento	56°C	1 minuto
Extensão	72°C	6 minutos
Extensão Final	72°C	10 minutos
Hold	4°C	-

4.7 Avaliação da capacidade dos recombinantes no acúmulo de PHA

A avaliação qualitativa da capacidade de acúmulo de clones recombinantes obtidos foi feita pelo o método de coloração com Sudan Black B, como descrito previamente (SCHLEGEL, 1970).

Para avaliação quantitativa, as linhagens recombinantes de *B. sacchari* e *P. putida* foram inoculadas em LB líquido contendo canamicina e incubadas em agitador rotativo a 30 °C por 24 horas. Após esse período, 5 mL do inóculo foram depositados em meio mineral com glicose 10g/L e canamicina. Após 24 horas foram adicionados diferentes fontes de carbono: ácido hexanóico 1g/L, ácido propiônico 1g/L, ácido butírico 1g/L, ácido valérico 1g/L, ácido hexanóico 1g/L, ácido heptanóico 1g/L, ácido octanóico 1g/L e ácido nonanóico 1g/L. Posteriormente a cultura foi mantida em agitação por mais 48 horas. Foram retiradas amostras com 24 e 72 horas de cultivo para análises posteriores (determinação de biomassa e PHA). Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicata, conforme previamente descritos por Gomez et al., 1996.

4.7.1 Teor e composição do polímero

Quantidade e composição de PHA: A quantidade e composição de PHA foram determinadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Cerca de 10 a 15mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos de vidro, aos quais foram adicionados 2mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2mL de 1,2-dicloroetano e 100µL de uma solução de ácido benzóico (40g/L) em propanol. Os tubos foram submetidos a uma temperatura de 100°C por 3 horas. Após o resfriamento, foram adicionados aos tubos 4mL de água destilada, agitando-os por 30 segundos. Após a separação da fase aquosa da fase orgânica, descartou-se a aquosa e a orgânica foi utilizada para a análise. A amostra foi analisada por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS ; MAI, 1988). Foi utilizado cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95%dimetil-polisiloxane, comprimento 30m, diâmetro 320 mm, espessura do filme 0,25µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste - Hélio (0,6 mL/ min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 3 minuto (6 C/min), elevação da temperatura até 180 °C por 5 minutos (6 °C/min) e até

240 °C por 1 minuto. Os propil-ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa (GOMEZ, 2000a).

4.7.2 *Massa seca celular (MSC)*

A biomassa foi determinada por gravimetria, centrifugando-se 10 mL do cultivo (10600 $\times$ g, 10min, 4°C) e submetendo-o à liofilização.

4.8 Determinação da concentração de ácidos orgânicos

A concentração de ácidos orgânicos foi determinada por cromatografia gasosa (CG) após acidificação da amostra (800 μ L) com 200 μ L de solução contendo HCl (0,2 mol/L) e ácido butírico ou ácido acético (4,8 g/L). Os ácidos orgânicos foram analisados em aparelho Agilent 7890A equipado com uma coluna capilar FFAP, após *split* das amostras (1:5). Hélio (3,0 mL/min) foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e detector (FID) foi 250 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi mantida a 130°C durante os primeiros 5 min. Então, a temperatura foi aumentada à razão de 10 °C/min até a temperatura final de 185 °C, a qual permaneceu por 1 min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade dos clones

Os 390 clones anteriormente confirmados como positivos para alguma das classes de PHA sintase (GALINDO, 2011) foram testados quanto a sua viabilidade. A tabela 7 mostra os clones que foram inviáveis, ou seja, que não apresentaram crescimento durante a recuperação da biblioteca metagenômica. Dos 390 clones que estavam mantidos em freezer – 80°C, 29 foram inviáveis. A inviabilidade dos clones, pode ter sido causada pelo tempo em que ficou armazenado no freezer sem que houvesse subcultivos periódicos. Por outro lado, a preservação em freezer – 80 °C é comumente utilizada com sucesso para preservação de linhagens por períodos que podem chegar até 10 anos, dependendo da linhagem, pois subcultivos periódicos podem levar à seleção de clones que não representativos da população original (SILVA et al., 1992).

Tabela 11-Relação dos clones que não apresentaram viabilidade durante a recuperação da biblioteca metagenômica

Placa	Clones inviáveis
6	H11
9	B3, A2, C10, E4, G1, D6, F7, A8, A9, A11
23	E6
24	D12
25	D12, E3, F9, E7
27	H1
29	D10
34	H1, E9
37	H12, F11
38	B9, C4, D6, A4, A3, E11

5.2 Avaliação dos clones positivos

5.2.1 Extração plasmidial

Devido ao baixo rendimento nas extrações plasmidiais iniciais, cerca de 20ng/μL, foram feitos diversos testes para aumentar a concentração de plasmídeos obtidos. Foram

alterados diversos parâmetros como: mudança dos lotes da arabinose e do antibiótico, aquecimento do tampão de eluição antes do uso e exclusão do buffer PB, que é opcional e indicado para cepas com atividade de endonuclease A. Nessa última condição o rendimento da extração plasmidial passou de 20ng/μL para 90-150 ng/μL. A figura 6 mostra o gel de agarose com o resultado da extração de alguns clones, que permitiu a confirmação de que a extração dos plasmídeos foi bem sucedida. A corrida eletroforética em gel de agarose foi feita com os plasmídeos fechados, o que impossibilita avaliar o tamanho exato de cada um, entretanto o objetivo era avaliar o o rendimento da extração.

Figura 6- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), mostrando o resultado da extração plasmidial dos clones A8,A4,E2,F5,B9,D6,F6,E6,G8,D5,C2 E A6 da placa 23. A seta indica a presença dos plasmídeos, próximo ao tamanho de 20.000 pb.

5.3 Experimento controle da amplificação

Anteriormente ao início das amplificações para a busca dos genes alvo nos clones da biblioteca, realizou-se um teste com os controles de cada classe com os diferentes oligos, para avaliar a especificidade de cada um deles. Foram empregados como DNA molde os seguintes controles:

- O plasmídeo pJM9131 (KIDWELL;VALENTIN ;DENNIS, 1995), controle da amplificação do primer de classe I, que abriga o operon de síntese de P3HB de *R. eutropha*,

foi testado para os primers phaCF1/phaCR4, I-179L (a)/I-179R(a) e B1F/B1R. Obteve-se um fragmento de aproximadamente 500 pb (figura 8) apenas com o primer phaCF1/phaCR4, o que era esperado para esse par de oligos, que foram desenhados a partir do alinhamento que incluíam sequências da PHA sintase de classe I (SHEU; WANG; LEE, 2000);

- O plasmídeo pBHR71 (LANGENBACH; REHM; STEINBÜCHEL, 1997), controle positivo da classe II que abriga *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa*. Esse controle também foi testado com os primers phaCF1/phaCR4, I-179L (a)/I-179R(a) e B1F/B1R. Nesse caso obteve-se um amplicon de 500pb com phaCF1/phaCR4 e de 540 pb I-179L (a)/I-179R(a).
- DNA genômico de *Bacillus megaterium*. M.A. 3.3, que foi testado com os primers phaCF1/phaCR4, I-179L (a)/I-179R(a) e B1F/B1R e apresentou um amplicon de aproximadamente 590pb somente com a utilização dos primers B1F/B1R, que confirmou o tamanho esperado para esse par de oligos. Os resultados estão na Fig.7.

A amplificação de genes das classes I e II pelos primers phaCF1/phaCR4 já era esperada, uma vez que para desenhar esses primers, sequências de PHA sintases de classe I e II foram alinhadas para a obtenção das regiões conservadas (SHEU; WANG E; LEE, 2000). Dessa forma, o ideal é que sejam desenhados primers que sejam capazes de se anelarem apenas com sequências codificadoras de PHA sintase de classe I. Entretanto, vários testes já foram realizados tentando buscar um par de iniciadores universal apenas para classe I, mas os resultados indicaram que é preciso separar as sequências de classe I em grupos com maior similaridade entre si e desenhar os primers de acordo com os grupos (LÍCIO, 2011). Isso decorre do fato de que sequências, ainda que consideradas de classe I, envolvem genes de organismos de gêneros distintos (ao contrário de classes II e IV em que predominam espécies *Pseudomonas* e *Bacillus*, respectivamente). Uma vez que no presente trabalho, utilizou-se uma biblioteca metagenômica que possui DNA de diversas espécies diferentes, pareceu mais apropriado utilizar um par de primers mais generalista, mesmo que amplificassem inespecificamente as classes I e II.

Tendo em vista a ausência de controle positivo contendo DNA molde para os primers de classe III, foram solicitados ao laboratório do Prof. Steinbuchel (Munster, Alemanha) dois plasmídeos: o pBluescript SK⁺::B28+, que abriga *phaEC* de *Thiocapsa pfennigii* e o plasmídeo pds37, que abriga *phaEC* de *Allochromatium vinosum* (LIEBERGESELL et al., 1994; LIEBERGESELL; RAHALKAR; STEINBÜCHEL, 2000). Ambos os plasmídeos, chegaram recentemente ao laboratório e por essa razão, não foram incluídos nesse experimento.

Figura 7-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) mostrando a amplificação obtida na reação de PCR pelo primer phaCF1/CR4 na presença de pJM9131(1) e pBHR71 (8) e a ausência de fragmentos quando DNA de *B.megaterium* foi utilizado como molde (9).A canelela 2 mostra a amplificação obtida com os primers I-179L (a)/I-179R(a), tendo pBHR71 como molde.Esses primers também foram utilizados nas reações presentes na canaletas 4 e 7, contendo como molde pJM9131 e *B. megaterium* respectivamente. Os primers B1F/B1R foram utilizados nas reações das canaletas 3,5 e 6, tendo como DNA molde *B.megaterium*, pJM9131,e pBHR71 respectivamente.

A confirmação dos clones positivos começou com reações de PCR, utilizando-se como DNA molde, amostras dos clones positivos, que consistiam em lisados (células dos clones lisadas por fervura) que foram utilizados anteriormente (GALINDO, 2011) e estavam armazenados em freezer -20°C. As primeiras amplificações realizadas, foram as dos clones previamente detectados como positivos para a classe II (Figura 8 e 9), que como pode-se observar vários foram confirmados como positivos. Entretanto, quando a PCR foi realizada com os clones positivos para a classe I, nenhum deles se confirmaram como positivo (figura 10 e 11). Tendo em vista que o clones já haviam sido confirmados anteriormente como positivos (Galindo, 2011), acreditou-se que o DNA dessas amostras poderia ter sido degradado, devido ao longo período armazenado no freezer e optou-se por recuperar os clones que estavam armazenados em freezer -80°C, fazer a extração plasmidial e posteriormente as amplificações.

Figura 8-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima, com o par de primer 179L (a)/I-179R(a).

Figura 9-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer 179L (a)/I-179R(a).

Figura 10-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.

Figura 11-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.

O plano inicial para a confirmação dos clones positivos, consistia em selecionar 5 clones de cada classe, fazer as amplificações com os respectivos primers, fazer o sequenciamento e após a confirmação da presença de *phaC* realizar a clonagem desses genes em linhagens mutantes PHA negativas. Entretanto, esses clones inicialmente selecionados não apresentavam amplificação e por isso tentou-se de diversas formas repadronizar a reação de PCR, mudando parâmetros como temperatura de anelamento, quantidade de DNA, entre outros de acordo com dados previamente descritos na literatura (GALINDO, 2011; LÍCIO, 2011). Tendo em vista que a tentativa da padronização não estava sendo eficiente optou-se

por outra estratégia, que consistiu em extrair os plasmídeos dos trezentos e noventa clones e fazer a amplificação com todos eles (figuras 12-27), fazendo um screening de toda a biblioteca supostamente positiva para diversas classes de PHA sintases, obtida anteriormente (GALINDO, 2011).

Figura 12-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4 para a classe I e 179L (a)/I-179R(a) para a classe II.

Figura 13-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.As setas vermelhas indicam os amplicons que foram enviados para o sequenciamento.

Figura 14-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de phaCF1/phaCR4 para a classe I e BIF/BIR para a classe IV.

Figura 15- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a).

Figura 16- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.

Figura 17-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.

Figura 18-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.

Figura 19-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer BIF/BIR.

Figura 20- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaCF1/phaCR4.

Figura 21-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a).

Figura 22-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a). As setas vermelhas, indicam os amplicons que foram enviados para o sequenciamento.

Figura 23-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer I-179L (a)/I-179R(a) para classe II e BIF/BIR para classe IV.

Figura 24-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer P1/P2 para as canaletas 1 e 4, phaC3F/phaC3F para as canaletas 2 e 6 e Haphapcr1/ Haphapcr2 para as canaletas 3 e 5. Todos esses primers são utilizados para a detecção de phaC de classe III. As setas vermelhas indicam os amplicons que foram enviados para sequenciamento

Figura 25- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaC3F/phaC3F

Figura 26-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer phaC3F/phaC3F

Figura 27-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR dos clones descritos acima com o par de primer *phaC3F/phaC3F*.

Em trabalho anterior (GALINDO, 2011) demonstrou-se que dos 390 clones positivos, 50 possuíam *phaC* da classe I, 120 da classe II, 67 da classe III e 153 da classe 4. No presente trabalho, 2 clones de classe II e 65 de classe III se confirmaram positivos. Os positivos de classe II e mais dois amplicon da classe III, foram enviados para sequenciamento, para confirmar se eram PHA sintase. O sequenciamento de dois amplicons que se mostraram positivos para classe III, indicou que se trata de falso positivos decorrentes provavelmente da falta de especificidade dos primers, o que leva à amplificação de sequências que não codifiquem uma PHA sintase. Isso acontece porque os primers utilizados de classe III apresentam um grande número de degenerações, o que os tornam relativamente inespecíficos. Entretanto essas degenerações são necessárias, pois não há um grande número de genes de PHA sintase de classe III sequenciados, o que limita a forma de desenhar os primers. Além disso, esses primers não foram anteriormente empregados na literatura para triagens, o que restringe sua aplicação (GALINDO, 2011; HAI et al., 2001).

Além dos artefatos metodológicos envolvidos na detecção de PHA sintase de classe III, pela limitação dos iniciadores, deve-se atentar para o fato de que os microrganismos portadores de tal gene são encontrados em ambientes aquáticos, como lagoas, águas salobras, restingas, estuários e habitats marinhos diversos. São, em geral, bactérias do enxofre, como espécies de *Allochromatium*, proteobacterias capazes de realizar fotossíntese, encontradas em zonas iluminadas anóxicas em lagos ou outros habitats onde se acumula o sulfeto de hidrogênio, não utilizando água como agente redutor, portanto, sem produzir oxigênio. Utilizam o H_2S , que é oxidado, gerando grânulos de enxofre elementar acumulados intracelularmente. Uma vez que a biblioteca foi feita a partir de solo de mata atlântica, a presença desses organismos nesse tipo de ambiente deve ser rara (GALINDO, 2011).

No *screening* inicial, feito com amostras de lisados dos clones, observaram-se 16 clones positivos. Dessa forma, a hipótese que gerou a necessidade de confirmar os resultados anteriores, leva à indicação de que os resultados iniciais eram falso-positivos.

Apesar de 139 clones de classe IV apresentarem inúmeros amplicons após a reação de PCR, nenhuma delas era do tamanho exato do controle positivo. A princípio acreditou-se que poderia se tratar de um novo gene PHA sintase, ou que o gene encontrado poderia conter algumas modificações. Entretanto, amplicons de 5 clones foram selecionados e sequenciados e os resultados indicaram que realmente se tratava de falso-positivos. A maioria dos amplicons apresentava similaridade com o gene anotado como codificador de uma holo-[acyl-carrier-protein] sintase, resultado já obtido anteriormente com o mesmo par de primers (GALINDO, 2011). A ausência de positivos de gene de PHA sintase classe IV em biblioteca metagenômica de solo foi observada anteriormente (DIMITROV, 2009), onde uma biblioteca inicial de um total 10.570 clones não apresentou nenhum amplicon positivo para o gene PHA sintase de classe IV, utilizando sondas com a sequência do primer B1F/B1R. Nesse trabalho, autor atribui a falta de amplificação à falta de sequências complementares ao primer.

Ao que parece, a detecção desse tipo de PHA sintase no solo é um problema metodológico, pois o solo é extramente rico em *Bacillus*, gênero em que é predominantemente encontrada *phaC* de classe IV. Além disso, problemas com esse primer já foi anteriormente relatado (SHAMALA et al., 2003) e acredita-se que uma forte limitação desse par de oligonucleotídeo seja o fato de que ele foi desenhado a partir de uma única sequência de PHA sintase *B.megaterium*. Um alinhamento de sequências de *phaC* de diversas espécies de *Bacillus* com a sequência do primer, feito no programa clustalW (figura 30 e 31), demonstrou que a região utilizada no alinhamento para delinear o não é uma região conservada. Para

confirmar a eficiência do primer, realizou-se um PCR “*in silico*” com a sequência de PHA sintase de diversas espécies de *Bacillus*, mas só foram obtidos resultados positivos para *Bacillus megaterium*. Outras espécies de *Bacillus* como *Bacillus pseudofirmus* OF4, *Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98 e *Bacillus cereus* E33L não apresentaram amplificação, pela falta de pareamento de sua sequência com a sequência do primer.

Vale ressaltar, que no trabalho anteriormente citado (DIMITROV, 2009) dos 10.570 clones que foram triados a partir dos macroarranjos, 8 foram positivos quando utilizou-se a sonda obtida com o primer phaCF1/phaCR4, 6 foram positivos quando utilizou-se a sonda obtida com o primer I-179L(a)/I-179R(a), 1 foi positivo quando utilizou-se a sonda obtida com o primer Haphapcr1/Haphapcr2. Entretanto, dos 14 clones detectados positivos, apenas 5 foram confirmados por PCR e os outros foram concebidos pelo autor como falso positivos, que podem ter aparecido pelo pareamento inespecífico durante a confecção das sondas, em que o DNA metagenômico do solo foi amplificado por PCR, com uso de primers degenerados (DIMITROV, 2009).

No presente trabalho, a biblioteca inicial continha aproximadamente 5.000 clones, dos quais 390 foram detectados como positivos a partir de reações de PCR. Após a confirmação desses resultados, apenas 2 foram detectados como positivos. Apesar de ser um resultado com grande discrepância do inicial, não é um número atípico para uma biblioteca metagenômica. Um trabalho que buscava por celulasas e enterases em uma biblioteca de 100 mil clones, obteve-se apenas 4 clones positivos (REES et al., 2003).

Outro caso similar foi observado na literatura, em um trabalho recentemente publicado, em que uma biblioteca metagenômica de solo contaminado por óleo (CHEEMA et al., 2012) foi construída, obtendo-se 2.1×10^6 clones, que foram triados com o primer phaCF1/phaCR4, dos quais foram obtidos 9 positivos para genes de PHA sintase.

Embora as técnicas de triagem de bibliotecas metagenômica apresentem algumas limitações, há algumas alternativas que se mostram cada vez mais eficientes. Em trabalho recente (ANEJA et al., 2004; SCHALLMEY et al., 2011), um grupo de pesquisadores conseguiu isolar genes de PHA sintase com sequências similares, mas substancialmente diferentes das PHA sintases conhecidas através da triagem fenotípica obtida por complementação. Nesse caso, a biblioteca foi construída em cosmídeos, que foram inseridos em *Sinorhizobium meliloti*, mutantes, PHA negativos. Dessa forma, os cosmídeos contendo os insertos grandes o suficiente para abrigar o gene inteiro foram capazes de complementar e restaurar a produção de PHA dessa linhagem.

Em trabalho feito em 2011 em nosso laboratório (GALINDO, 2011), foi realizado um teste para verificar se a triagem poderia ser feita por avaliação fenotípica, utilizando *E. coli* como hospedeira e a detecção de clones produtores de PHA, utilizando a coloração de Sudan Black B, após cultivo em meio sólido sob condições propícias ao acúmulo. Entretanto, o vetor utilizado nessa biblioteca não é um vetor de expressão, o que exige que o inserto contenha além do gene, o seu promotor. Nesse experimento não foi obtido nenhum clone capaz de produzir PHA após o recebimento do inserto, o que sugere que os vetores não possuíam a sequência dos genes e seus promotores.

```

Bacillus_cereus_biovar_anthrac      CGTGGTTTTGATGTGTATATGCTTGATTGGGGCACATTGGTTTAGAAGA 347
Bacillus_thuringiensis_serovar      CGTGGTTTTGATGTGTATATGCTTGATTGGGGCACATTGGTTTAGAAGA 347
Bacillus_cereus_E33L_chromosom      CGTGGTTTTGATGTGTATATGCTTGATTGGGGCACATTGGTTTAGAAGA 347
Bacillus_weihenstephanensis_KB      CGTGGTTTTGATGTGTATATGCTTGATTGGGGCACATTGGTTTAGAAGA 347
Bacillus_cytotoxicius_NVH           CGTGGTTTTGATGTGTATATGTTAGACTGGGGAACATTGGCTTAGAGGA 347
Bacillus_megaterium_WSH-002         CGCGGTTTTGACGTGTATTGCTTGACTGGGGAACTCCTGGGCTTGAAGA 350
Sequencia_amplicon                  -----AACTCCTGGGCTTGAAGA 18
                                     **   **  *  ***

```



```

Bacillus_cereus_biovar_anthrac      TAGTCATTTGAAATTTGATGATTTGCTGTTTGATTATATTGCAAAAGCAG 397
Bacillus_thuringiensis_serovar      TAGTCATTTGAAATTTGATGATTTGCTGTTTGATTATATTGCAAAAGCAG 397
Bacillus_cereus_E33L_chromosom      TAGTCATTTGAAATTTGATGATTTGCTGTTTGATTATATTGCAAAAGCAG 397
Bacillus_weihenstephanensis_KB      TAGTCATTTGAAATTTGATGATTTGCTGTTTGATTATATTGCAAAAGCAG 397
Bacillus_cytotoxicius_NVH           TCGTCATTTGAAATTTGATGATTTGCTGTTTGACTATATTGCAAAAGCAG 397
Bacillus_megaterium_WSH-002         CAGCAATATGAAGCTAGATGATTATATTGTAGATTATATTCCAAAAGCGG 400
Sequencia_amplicon                  CAGCAATATGAAGCTAGATGATTATATTGTAGATTATATTCCAAAAGCGG 68
                                     *  ** *****  *  *  *  ***** *****

```

Figura 30 Alinhamento da sequência do primer B1F (destacada em amarelo) com as sequências de phaC de diversas espécies de *Bacillus*

```

Bacillus_cereus_biovar_anthrac      AATATTTCCGGGAAACGTGATCATATCGCTCTGCCATGCCAAGTAGAAGC 947
Bacillus_thuringiensis_serovar      AATATTTCCGGGAAACGTGATCATATCGCTCTGCCATGCCAAGTAGAAGC 947
Bacillus_cereus_E33L_chromosom      AATATTTCCGGGAAACGTGATCATATCGCCCTGCCATGCCAAGTAGAAGC 947
Bacillus_weihenstephanensis_KB      AATATTTCTGCGAAACGTGATCACATTGCTCTGCCATGTCAAGTAGAAGC 947
Bacillus_cytotoxicius_NVH           AACATTTCTGCTAGACGTGATCACATTGCTTTACCGTGTCAGTAGAAGC 947
Bacillus_megaterium_WSH-002         AACATTGCTGCTAGCCGTGATCATATTGCGATGCCGATCAAGTGGCAGC 950
Sequencia_amplicon                  AACATTGCTGCTAGCCGTGATCATATTGCGA----- 599
                                     ** *** *  *  ***** **

```

Figura 31 Alinhamento da sequência do primer B1F (destacada em amarelo) com as sequências de phaC de diversas espécies de *Bacillus*

5.4 Sequenciamento de fragmentos de DNA dos clones positivos

Após a obtenção dos clones positivos, as amostras de DNA foram enviadas para o sequenciamento e foram analisadas para a obtenção da sequência consenso. Segue abaixo a

sequência do DNA obtido do clone P12F10. As sequências restantes de classe IV encontram-se no apêndice.

A amplificação a partir do clone P12F10 (figura 14), apresentou 4 bandas que foram enviadas para o sequenciamento:

Banda de 750 pb - 96% de similaridade com hypothetical protein de *E.coli*

TTTTTTTTGWTGYCTCTCSGCTGGTTTTACTTACCCACCGCGCGGATACCGGGTGCCAGGAGAACT
GGTTTGCTGGAAACAGCCACGGGCCGCGATTTCTGAGGCTTCTTTACCGCTAATTTCTTGSCGSATC
CATTCCCGCGCAGCTTCTGGCGACAGTACCAGTGGGCGGCGGTCATGAATATCTACCAGACCTTGA
TCTGCCGCAGCAGTGACGATCAAAAATCCTTCGGCTTCGTCACCACGCTCAAATGGTGTGCTACCT
ATCGCGGCCATAAAAATAGGTTGTCCATCAGCACGATAGATAAAAAAAGGCTGTTTTTTGTGCGCCT
TCTTTTTTCCACTCAAACCAGCCATCGGCAAAACAGATTGCCCCGACCATGTTGCCAGAGCGGTTTA
AACATACGACTGGTTGCCGCGAGTTTCTACGCGGKCKTTTWTGAGCGGCGGTTTATCCCACCWTCGG
GGAGCATATCCCCAGAAAACCGGATCCAGATGAAGGTGTTTCATCACGTTCACTGAGCAGWAGGAC
TTTGGTTCCCCGGCGCGACGTTGTATCTGCCAATGGGTTTCGGGATCATAGGGAAATATCGCGTTCA
ATATCTTCCGCGAGAAGCGCARGGTAAWYCTTCACGCGTTGGGGATTGGGSCAAAGCGTCCACMC
ATAGAAACCTCCTGAKATCATACTGAAAAGAATAGGAGTGGGGGGCGGGWAAAATCTATGGGAY

Banda de 700 pb – 99% de similaridade com Holo-[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

TTGAGGGTGCATGCTGCACAAAATTAAGTTAAAAAGTAAAACCCCCGTTCTTACCAGTTCGGGG
GTTTTACTTTTTAAAGAGAACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGCATAGTG
CCGCTCATCTGCCAGCGTTACATG—TATTTGCAACGCCCAGCTTTTCCGCCA

Banda de 450 pb - 99% de similaridade com Holo-[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

GATCTGTGGCATGGTGTAAGCACAGCAAATCTTCAATAACGAAGCCAATTTTAATGTACTTCGAAT
TGCGGGTCACGTTAATCTTTCCATCAATATTGCTTTCTTCGTAAAGGCTCGAGTTTTTATGCTAAAG
ATTGCAAGTTGCTTGTAAGATAAGTACACTGATCCATAATCGCTGTTGTTGAGGGTGCATGCTG
CACAAAATTAAGTTAAAAAGTAAAACCCCCGTTCTTACCAGTTCGGGGGTTTTACTTTTTAAAG
AGAACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGCATAGTGCCGCTCATCTGCCAGC
GTTACATGCATATTTGCAACGCCCAGCTTTTCCGCCAGTTTAAATGCCTCGCCCCATAGCCGTAGCC
GTGATCATTATTGCG

Banda de 400pb - 99% de similaridade com Holo -[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

GGATCTGTGGCATGGTGTAAGCACAGCAAATCTTCAATAACGAAGCCAATTTTAATGTACTTACG
AATTGGCGGTCACGTTAATCTTTCCATCAATATTGCTTTCTTCGTAAAGGCTCGAGTTTTTATGCTA
AAGATTGCAAGTTGCTTGTAAGATAAGTACACTGATCCATAATCGCTGTTGTTGAGGGTGCATG
CTGCACAAAATTAAGTTAAAAAGTAAAACCCCCGTTCTTACCAGTTCGGGGGTTTTACTTTTTAA
AGAGAACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGCATAGTGCCGCTCATCTGCCA

GCGTTACATGCATATTTGCAACGCCAGCTTTTCCGCCAGTTTAAATGCCTCGCCCCATAGCCGTAG
CCGTGATCATATTG

Os controles positivos das classes I, II e IV foram enviados para o sequenciamento para confirmar que se tratava da sequência de genes da PHA sintase e suas sequências apresentaram 99%, 99% e 96% de similaridade com o gene de PHA sintase de *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus megaterium* respectivamente.

Os DNAs obtidos a partir dos clones positivos de classe III, P23G8 e P23D5 (figura 26), também foram enviados para o sequenciamento e ambos apresentaram similaridade com o gene Glutamina sintetase de *E. coli*. Esse resultado também foi obtido no trabalho de Galindo, que justificou esse resultado, pelo alto número de degenerações no primers, o que faz com que ele seja complementar a sequências inespecíficas (GALINDO, 2011).

P23G8 – 99% de similaridade com glutamina sintetase de *E.coli*

CCGACCACCAACTCTTATAAGCGTCTGGTCCCGGGCTATGAAGCAGCTCTAATGCTGGCTTACTGT
GCGCGTAACCGTTCTGCGTCTATCCGTATTCCGGTGGTTTCTTCTCCGAAAGCACGTCGTATCGAAG
TACGTTTCCCGGATCCGGCAGCTAACCCGTATCTGTGCTTTGCTGCCCTGCTGATGGCCGGTCTTGA
TGGTATCAAGAACAAGATCCATCCGGGCGAAGCCATGGACAAAAACCTGTATGACCTGCCGCCAG
AAGAAGCGAAAGAGATCCACAGGTTGCAGGCTCTCTGGAAGAAGCACTGAACGAACTGGATCTG
GACCGCGAGTTCTGAAAGCCGGTGGCGTGTTCACTGACGAAGCAATTGATGCGTACATCGCTCTG
CGTCGCGAAGAAGATGACCGCGTGCGTATGACTCCGCATCCGGTAGAGTTTGAGCTGTACTACAGC
GTCTAAGTGTTTTAGTTGCCGTGGA

P23D5 - 95% de similaridade com glutamina sintetase

ACGCTGTAGTACAGCTCAAACCTTACCGGATGCGGAGTCATACGCACGCGGTCATCTTCTTCGCGA
CGCAGAGCGATGTACGCATCAATTGCTTCGTCAAGTGAACACGCCACCGGCTTTGAGGAACGCGGTC
CACAGATCCAGTTCGTTCAAGTGTCTTTCGAGAGAGCCTGCAACCTGTGGGATCTCTTTCGCTTCTT
CTGGCGGCAGGTCATACAGGTTTTTGTCCATGGCTGCCCGCATGGATCTTGTTCTTGATATAATAAA
GACCGGCCATCAGCAGGGCAGCGAAGCACAGGTACAGGTTTTCGCTGGGATCCGGGAAACGTACT
TCGATACGACGTGCTTTCGGAGAAGAAACCACCGGAATACGGATAGACGAGAACGGTTACGCGC
AGAGTAAGCCAGC

Os dois clones positivos de classe II, P34E10 e P34H3 foram os únicos que realmente apresentaram similaridade com a sequência de pha sintase:

P34F10 – 99% de similaridade com poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

GGGCGCATCCAGGCGAACACCTTGGCCATGTCCTTGCCCTCCAGCACGCCGGACTGGTAGGAACGA
CGCTTGGCGGCCTCCAGAGTCTTCTCGTCGGCGAACAGCGCGACCTGGGTATTAGTTTCAAGTGC
AGCACGCTGACCAGTTGGGTGAAGGCGTTGACCTTCTTCTCGCCGCTGGCCACGTAGTGGCCGACC
AGGGTCGCGGTGGTGATCCCGCCGGAGCAGGCGCCGAGGAGGTTGAGGTCTTTGCTGCCGGTGATC

GACAGGACTACCTCGATGGCCTCCTTGAGCGCCTCGATATAGGTGGTCAGGCCCCATTCGCGCTGC
GACTTGGTCGGGTTGCGCCAACTGACGATGAAGGTCTGCACGCCGTTGCGCAGG

P34E3 – 99% de similaridade com poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase 1 de *Pseudomonas aeruginosa* LESB58

CAGTAGTTCCAGATCAGGTCGTTGGGGCGCATCCAGGCGAACACCTTGGCCATGTCCTTGCCCTCC
AGCACGCCGGACTGGTAGGAACGACGCTTGCGGGCCTCCAGAGTCTTCTCGTCGGCGAACAGCGC
GACCTGGGTATTTCAGTTCTGAAGTCGAGCACGCTGACCAGTTGGGTGAAGGCGTTGACCTTCTTCTC
GCCGCTGGCCACGTAGTGGCCGACCAGGGTCGCGGTGGTGATCCCGCCGGAGCAGGCGCCGAGGA
GGTTGAGGTCTTTGCTGCCGGTGATCGACAGGACTACCTCGATGGCCTCCTTGAGCGCCTCGATAT
AGGTGGTCAGGCCCCATTCGCGCTGCGACTTGGTCGGGTTGCGCAACTGACGATGAAGGTCTGCAC
GCCGTTGCGCAGGCAGAAGCGCGCCAGGCTCTTGTCCGGCGACA

5.5 Amplificação e sequenciamento do inserto dos clones Classe II positivos

Os plasmídeos presentes nos clones P34F10 e P34H3, detectados previamente como positivos por gerarem amplicons indicativos da presença de genes codificadores de PHA sintase do tipo II (Fig. 24), foram submetidos a um sequenciamento para verificar se os insertos apresentavam os genes íntegros ou seus operons. Para amplificação das regiões a serem sequenciadas, foram utilizadas combinações de primers que se anelam a regiões do pBAC com os primers que se alinham com regiões da PHA sintase de classe II. As amplificações enviadas para sequenciamento foram previamente verificadas em gel de agarose (Fig 22 e Fig 23).

Figura 28-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR do plasmídeo do clone P34H3, utilizando-se o par de primer

A partir do clone P34H3, empregando-se os primers T7 e I-179L, foi obtido o sequenciamento apresentado a seguir. Essa sequência obtida (Seq_2) foi alinhada com a sequência da PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Seq_1). O alinhamento indica ausência das regiões inicial e terminal do gene presente do BAC.

Seq_2 do clone P34H3

```
GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCGGGGGATCCTTTTTCATCGTTCATGCACGTAGG
TTCCGGGCGCGGCTTCGCCGGCCGGATAGGTCTTGTTGCCAGGCTGGCGGGCGCCTTGCGGGTCT
TGCCGGAGCGTTCGGCCAGCCATTGCTGCCAGTGCAACCACCACGAGTCGGCGTGCTTGCCGGCCT
GTTCCAGCCAGGCCTTGCGGCTCGGCGGGCAGTTCCGGATTGGTCATGAAGCGTGCCTTGCGGGTTGC
CCGGTGGGTTGAGGATGCTCTGGATGTGACCGCTGTTGGAGAGGATGAACTCGCACTTGCCACCCA
GCAGCCTGGCCGACTTGTAGCACGACTCCCAGGGGGTGATGTGGTTCGTTTCAGACCGGCGACACAGT
AGAAGTCGCAAGTCACCTGCTTCAGGTCGATGGGCGTGCCGGAGACCTCCAGGGCGCCGGGGCGG
TTCAGCGGGTTGCTCTTGAACAGTTCGACGAACTCGCCGTGCAGCGCGGGCAGGCGCGTGGTG
TCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTGCAACGCCGGCGGCTGGTTGCCGAGCAGGTAGTTGTTGACCCAG
TAGTTCCAGATCAGGTCGTTGGGGCGCATCCAGGCGAACACCTTGCCATGTCCTTGCCCTCCAGC
ACGCCGGAAGTGGTAGGAACGACGCTTGCGCGCCTCCAGAGTCTTCTCGTCGGCGAACAGCGCGACC
TGGGTATTCAAGTTCGAAGTCGAGCACGCTGACCAGTTGGGTGAAGGCGTTGACCTTCTTCTCGCCG
CTGGCCACGTAGTGGCCGACCAGGGTCGCGGTGGTGATCCCGCCGGAGCAGGCGCCGAGGAGGTT
GAGGTCTTTGCTGCCGGTGATCGACAGGACTACCTCGATGGCCTCCTTGAGCGCCTCGATATAGGT
```

GGTCAGGCCCCATTCGCGCTGCGACTTGGTCGGGTTGCGCCAACTGACGATGAAGGTCTGCACGCC
GTGCGCAGGCAGAAAG

```

6 Seq_1 1683 -----TCAGCGTATATGC 1671
7                               ||| ||| |||
8 Seq_2 1 GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTTTCATCGTTCATGC 60
9
10
11 Seq_1 1670 ACGTAGGTGCCCGGGCCGCTTCGAGGGGCGGATGCGCGGCGCTGCCAAGGTTGAAGTCA 1611
12 ||||| || || || ||||| || ||||| | |||| ||| || |
13 Seq_2 61 ACGTAGGTTCCGGGCGCGGCTTCGCCGCGGATAGGTCTTGTGCCCAGGCTGGCGGGC 120
14
15
16 Seq_1 1610 GGGTTGCCAGCTCGCCCGAGCGCTCCTGCAGCCAGCCAGCCAGACCGGCCACCAGCTG 1551
17 | |||| || || || ||||| || ||||| | |||| | ||||| |
18 Seq_2 121 GCCTTGCGGGTCTTGCCGAGCGTTGCCAGCCATTGCTGCCAGTGCAACCACCACGAG 180
19
20
21 Seq_1 1550 CCCTCTTCGCGCTTGCGCTCGTAGTACCAGGCGCGTGGATCGCTGCTCAGCTTGTCGTTTC 1491
22 | | | ||| | | ||||| || ||| | ||| | ||
23 Seq_2 181 TCGGCGTGCTTGCCGGCCTGTTCCAGCCAGGCCTTGGGCTCGGCGGGCAGTTCGGGATTG 240
24
25
26 Seq_1 1490 TCGAAGTAGCAGGCCTTGGGGTTTCCGGGAGGGTTGAGGATGCTCTGGATGTGCCCGCTG 1431
27 | | ||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
28 Seq_2 241 GTCATGAAGCGTGCTTGCGGGTTGCCCGTGGGTTGAGGATGCTCTGGATGTGACCGCTG 300
29
30
31 Seq_1 1430 TTGGACAGGATGAAGCGGCGCTGGCCGCCAGCAGGAGGGCCGAGCGATACACCGCGTCC 1371
32 ||||| ||||| || || || ||||| ||||| || || || |||
33 Seq_2 301 TTGGAGAGGATGAACCTCGCACTTGCCACCCAGCAGCCTGGCCGACTTGTAGCACGACTCC 360
34
35
36 Seq_1 1370 CAGGGCGTGATGTGGTCGGTGATGCCGGCGACGTGGAAGCTGTTCGATCGCCACCTTGCCC 1311
37 ||||| ||||| || || || ||||| ||||| || || || ||||| |
38 Seq_2 361 CAGGGGGTGATGTGGTCGTTGACACCGGCGACACAGTAGAAGTCGAAGTCACCTGCTTC 420
39
40
41 Seq_1 1310 AGGTCCACCGCGGTCCCGCTGACCTCCAGCGCGCCCGGGCGGGTCAGCGGGTTGTGCTTG 1251
42 ||||| | | || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
43 Seq_2 421 AGGTTCGATGGGCGTGCCGGAGACCTCCAGGGCGCCGGGGCGGTTACAGCGGGTTGCTCTTG 480
44
45
46 Seq_1 1250 AACAGGTCGAGCAGTTCGCCGTGGAACGCCGCGGGCAGCCGCGTGTGTCGTTGTTCCAG 1191
47 ||||| |||| | ||||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
48 Seq_2 481 AACAGTTCGACGAACCTCGCCGTGCAGCGCGGGCGGAGGCGCGTGGTGTGCTGTTCCAG 540
49
50
51 Seq_1 1190 TAGAGGATGTGGAACGCCGCGGCTGCCTGCCGAGCAGGTAGTTGTTGACCCAGTAGTTC 1131
52 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
53 Seq_2 541 TAGAGGATGTGGAACGCCGCGGCTGGTTGCCGAGCAGGTAGTTGTTGACCCAGTAGTTC 600
54
55
56 Seq_1 1130 CAGATCAGGTCGTTGGGGCGCATCCAGGCGAACACCTTGCCCATGTGCGCGCCGTCAGC 1071
57 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
58 Seq_2 601 CAGATCAGGTCGTTGGGGCGCATCCAGGCGAACACCTTGCCCATGTG---CTTGCCCTCC 657
59
60
61 Seq_1 1070 ACGCCATGCTGGTAGGAGCGGCGCTTGCTGCTCTCCAGGCTCTGCTCGTCGGCGAAGAGC 1011
62 | | | || || || || || || || || || || || || || || ||
63 Seq_2 658 AGCACGCCGACTGGTAGGAACGACGCTTGCGGCGCTCCAGAGTCTTCTCGTCGGCGAAC 717
64
65
66 Seq_1 1010 ATCGCCGGGCTTTCATCTGGCTGTCGAGCAGGCTGACCAGGTAGGTGACGCTACTGACC 951
67 | ||| || || || || || || || || || || || || || || ||
68 Seq_2 718 AGCGCGACCTGGGTATTTCAGTTCGAAGTCGAGCACGCTGACCAGTTGGGTGAAGGCGTTG 777
69
70
71 Seq_1 950 TTGCGCAGTTGCCGGCGCACCTGCAGGTGGCCGAGCAAGGCGGCTACGTTGAGCCCGCG 891
72 | | | || || ||||| || || || || || || ||||| |||||
73 Seq_2 778 ACCTTCTCTCGCCGCTGGCCACGTAGTGGCCGACCAGGTCGCGGTGGTGATCCCGCCG 837

```


O clone P34F10 (Fig. 24) também teve o seu DNA plasmidial parcialmente sequenciado a partir de amplicons obtidos por combinação dos primers I179L e T7. O gel do amplicon e a sequência obtida se encontram abaixo:

Figura 29-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação por PCR do plasmídeo do clone P34E10, utilizando-se o par de primer I-179R(a)/Sp6 e I-179L (a)/ T7. A sequência dos primers Sp6 e T7 está presente no vetor pBAC/oriV.

Seq_2 do clone P34F10

```
CRGGTCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCGGGGGATCCT
TTYCWTCGTTTCATGCACGTAGGTTCCGGGCGCGGCTTCGCCGGCCGGATAGGTCTTGTTGCCAGG
CTGGCGGGGCGCCTTGCGGGTCTTGCCGGAGCGTTTCGCCAGCCATTGCTGCCAGTGCAACCACCAC
GAGTCGGCGTGCTTGCCGGCCTGTTCCAGCCAGGCCTTGGGCTCGGCGGGCAGTTCCGGATTGGTC
ATGAAGCGTGCCTTGGGGTTGCCCGGTGGGTTGAGGATGCTCTGGATGTGACCGCTGTTGGAGAGG
ATGAACTCGCACTTGCCACCCAGCAGCTGGCCGACTTGTAGCACGACTCCCAGGGGGTGATGTGG
TCGTTTCAGACCGGCGACACAGTAGAAGTCGCAAGTCACCTGCTTCAGGTCGATGGGCGTGCCGGAG
ACCTCCAGGGCGCCGGGGCGGTTTCAGCGGGTTGCTCTTGAACAGTTCGACGAACTCGCCGTGCAGC
GCGGCGGGCAGGCGCGTGTTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTCGAACGCCGGCGGCTGGTTGCCG
AGCAGGTAGTTGTTGACCCAGTAGTTCCAGATCAGGTCGTTGGGGCGCATCCAGGCGAACACCTTG
GCCATGTCTTGCCCTCCAGCACGCCGACTGGTAGGAACGACGCTTGGCGGCCTCCAGAGTCTCT
CGTCGGCGAACAGCGCGACCTGGGTATTCAGTTCGAAGTCGAGCACGCTGACCAGTTGGGKGAAG
GCGTTGACTTCTTCTCGCCGCTGGCCACGTATGGCGACAGGTCGCGGTGGGTGATCCCGCGGAGCA
GGCGCCGAGGAGGTGAGTCTTGCTGGCGGTGATCGAMAGACTACCTCGATGCTCTGACGCCTCGAT
TAGTGTTCAGTCATCGCTGCACTGGTCGTGCCACTGACATGAGGYTGACCCGTTGGCCAAGCG
```

Essa sequência também foi alinhada com o gene PHAC de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (seq 1)


```

224
225
226 Seq_1 891 GACTACCTCGATGCTCTGACGCCTCGATTAGTGTCAGTCATCGCTGCACTGGTCGTGCCC 950
227      |      ||      |      |      |      |      |      |      |
228 Seq_2 849 CTCGCGGCTGACCTCGATGGCCTGGTCGAGGGCCTCGACATAGGTGCTCAGGCCCCATTC 790
229
230
231 Seq_1 951 ACTGACATGAGGTGCACCCGTTGGCCAAGCG----- 981
232      | |      || |      |      |      |||| |
233 Seq_2 789 GCGGTGCTGGGCGTCGGGGTTGCGCCAAC TGATGACGAAGACCTGCAGGTTGTTCTTCAG 730
234
235
236 Seq_1 982 ----- 981
237
238 Seq_2 729 GGCGTACTGGACGAAGCTCTTTTCCGGCGACAGGTCGAAGATGTAGTACTTGTGATCTG 670
239
240
241 Seq_1 982 ----- 981
242
243 Seq_2 669 CGGCGGCACGATCAGCAGGGGCTTGGCGTACTGGCGCTCGCCCAGCGGCTTGTACTGGAT 610
244
245
246 Seq_1 982 ----- 981
247
248 Seq_2 609 CAGCTCCAGCACCTCGTTGCGGAACACCACCGCGCCTTGCCTGGTGGCGAGGTTGCGACC 550
249
250
251 Seq_1 982 ----- 981
252
253 Seq_2 549 GATCTCGAAGGCGGTCTTGTTACCTGGCTGGGCATGCCGCCGTTGTGCACCAGGTCTTC 490
254
255
256 Seq_1 982 ----- 981
257
258 Seq_2 489 GAGCAGGTGGCGGACGCCATTGAGCAGGCTGATCCCGCCGTTATTGAACAGTTCCTTTAA 430
259
260
261 Seq_1 982 ----- 981
262
263 Seq_2 429 CGCCAGTGGATTGATCAGGCTGTTGCTGGGTGCCACGCGCTCGGAGAGCAAGGCGACGAG 370
264
265
266 Seq_1 982 ----- 981
267
268 Seq_2 369 GAAGCGGGCGCGGGCGCGATCGTCGCAGTCCAGGTTGCTTTCGTCGATCCAGGCGAGCAG 310
269
270
271 Seq_1 982 ----- 981
272
273 Seq_2 309 TTGTTTCTGCCACGCCAGGTAGGCCTGCAGGTGCGCCGTTAGAAGGGATTGAGGCGCCA 250
274
275
276 Seq_1 982 ----- 981
277
278 Seq_2 249 GGATGGATCCTGGAAGCGGGCGTCCTGTGGGTTCGGCTGGTGCAGGGTGTGCCCCAGCAG 190
279
280
281 Seq_1 982 ----- 981
282
283 Seq_2 189 CACCTTGCCCAACTGGCCTCCGAAGGCGACCAGGTGCCGCGCACTGTGCAGCGGCTGGCG 130
284
285
286 Seq_1 982 ----- 981
287
288 Seq_2 129 CAGGCCGTGGACAGCCAGGCTGCGGACCGTCGTCAGCAGGTCCTTGCCGCGCAGGCCGAC 70
289
290
291 Seq_1 982 ----- 981
292
293 Seq_2 69 GATGGCGCTCTGTGCACTCATGAACTCGGCGGGCACCGGCACGCTACCCGATTCTGCTT 10
294
295
296 Seq_1 982 ----- 981
297
298 Seq_2 9 TTCTCGCAT 1

```

Tendo em vista que nenhum dos clones detectados como positivos para a presença de PHA sintase II possuía o gene completo, foi impossível realizar sua clonagem. Em ambos os clones que abrigavam o gene, o códon de início e de terminação estavam ausentes, o que impossibilita sua expressão.

5.6 Detecção da presença do gene *phaC* em *Spirulina sp* e *Synechococcus sp*

A PHA sintase de classe III é a menos conhecida e sua expressão em mutantes PHA negativos ainda não foi amplamente estudada. Por isso, fez-se um levantamento na literatura, buscando organismos que possuíssem esse gene, para que futuramente ele pudesse ser clonado em mutantes, assim como o plasmídeo pBluescript SK::B28+. Dentre os trabalhos que foram encontrados, muitos deles citavam *Spirulina sp* e *Synechococcus sp* como boas produtoras de PHA e como portadoras do gene *phaC* de classe III (MIYAKE et al., 1997; TARONCHER-OLDENBURG, NISHINA E STEPHANOPOULOS, 2000; HAI; HEIN; STEINBÜCHEL, 2001).

As duas cepas foram gentilmente doadas pelo Instituto Oceanográfico-USP. Após a preparação citada no item 2.6.8 o DNA das cianobactérias foi submetido a uma reação de PCR, utilizando os pares de primer P1/P2, Haphapcr1/2, phaE3R/F e phaC3R/F. Os resultados (figura 30) confirmam que tanto *Spirulina sp* quanto *Synechococcus sp*, são portadoras de genes codificadores da PHA sintase de classe III.

Figura 30- Eletroforese em gel de agarose 0,8%, resultante da PCR das cianobactérias *Spirulina* sp e *Synechococcus* sp utilizando os pares de primer P1/P2, Haphapcr1/2,phaE3R/F e phaC3R/F.O controle positivo nesse caso é plasmídeo pBluescript SK::B28+.

Os tamanhos dos amplicons do controle positivo também estão de acordo com o esperado para cada primer. Entretanto, aparentemente o primer Haphapcr1/2 foi o único que gerou um amplicon no tamanho esperado quando se utilizou o DNA das cianobactérias como "molde". Esses amplicons obtidos na reação de PCR do DNA da *Spirulina* sp e *Synechococcus* sp indicaram que ambas são portadoras da PHA sintase de classe III. Os resultados foram confirmados através do sequenciamento dos amplicons obtidos.

Spirulina sp

```

GMTTGCTACGMRTACCRYWYGTGATMKGSGWAKTYRCWGMCGYKYGGGGRYTTGATRTYTAYYTS
ATYGATTGGGGATATCCTACCCCTGSMGATCGCTGGYTAACCCTAGGYGATTATATCTWTGGCTAT
ATGAATGACTGTGTTGATTTTCTTSCSATCACTATGAACTCCATAAAATCAACCTCCTAGGAGTTT
GTCAGGGAGGAACCTTTCCCCCTGCTTGCRKTCCCTATATCTGAAAAAGKKGCAAAACCTAATCA
CCATGGTTGSCCGGTCAACTTTTAACTGCCRAATACCCTCTTAAATGSKGGGGGAGGCTGCMCAT
TGCTGACCTCACMCKKAAATATTGACCTCATGTTTGAGGSTTTWKGCTGAATCCSCCAACTATCC
CAACAGCCRGTTCTTGAGGWTGWACCCCTACCTGAGGATATCWGAAATATCTCGATTTCGCCAAAT
CRTGGAAAATCTTSACAAATCCTAAACTGTCTMTCATKGWMCAGKGGATMTTATWRKYCCGRA
80% de similaridade com PHA sintase de Arthrospira platensis NIES-39
Query cover:80%

```

Synechococcus sp

GCTGCTCCTCGCGATGTCGGCCACATCCAGCATGACCACAYACTTTTGCASATTCAACCGGAACGG
 STTTRAGGKGAGGTARGACACATTCMGTAATCCCCTGGAACATTGCCMAGCGCTTTCACTGKGAG
 GWCAGCATCCGAGTCCATCGCCCACTTGGTGAGCAAGTTATCGGAGGTTTGAAAATCSACGGGCGT
 CRCCMTGGKGATCAAGTTACSCACATTCTCASGGTGCGCGGCTGCWTARCAKGTGGCKAAAACGC
 CTCCCTGACATACACCGACCAAATTCACCTGCGGACTTTTGGTCATCKTTTGGACCTGCTCTACMCA
 ATCATGCARGKAGCCMAAGATGTAATCSCCTARGCTGGWAAACCGATCTGCASGGWCSGGGTAGC
 CCCMATCSAWGAGGKAAATATCATGSCCCGCKCGGCTCAATGCACCCRACACACTGCGGTCTGTGCT
 GTAAGTCCATCATRTAYGGCKRTTYACCAAMGCGTAATGAWWTWAAAAMAAA

70% de similaridade com PHA sintase (subunidade C) de *Magnetococcus marinus* MC-1

É importante ressaltar que o genoma dessas cianobactérias não está totalmente sequenciado e não temos a sequência completa da PHA sintase desses gêneros.

5.7 Confirmação da presença do gene *phaC* no plasmídeo pBluescript SK⁺::B28+

Diante da baixa quantidade de clones positivos obtidos até este ponto, foi delineada uma nova estratégia, que consistia em buscar novas fontes de genes para a expressão heteróloga em cepas PHA negativas. Dessa forma, dois plasmídeos, descritos na literatura, foram gentilmente doados pelo Prof Steinbüchel, da Universidade Westfälische Wilhelms (Münster, Alemanha). O plasmídeo pBluescript SK⁺::B28+ (LIEBERGESELL; RAHALKAR ; STEINBÜCHEL, 2000) contém os genes *phaC* e *phaE* de *Thiocapsa pfennigii* enquanto o plasmídeo pds37 contém o gene *phaE* e *phaC* de *Allochromatium vinosum* (Liebergesell et al., 1994; LIEBERGESELL; RAHALKAR ; STEINBÜCHEL, 2000).

Para manter o estoque dos plasmídeos ambos foram inseridos por eletroporação em *E. coli* DH5α, selecionando-se os clones que se tornaram resistentes a ampicilina. Destes, foi feita a extração plasmidial, cujo DNA foi posteriormente, submetido à reação de PCR para confirmar, pelo sequenciamento, a presença do gene codificador da PHA sintase desejada. Esses genes foram clonados em vetor pBBR2MCS-1 e transferidos para uma *Burkholderia sacchari* e *Pseudomonas putida* mutantes, PHA negativas e avaliar produção e a natureza do PHA gerado. Estudos anteriores (VALENTIN et al., 1994; VALENTIN; SCHONEBAUM; STEINBUCHHEL, 1996) demonstraram que mutantes PHA negativas de *Pseudomonas putida* abrigando *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii* foram capazes de acumular poliéster composto por 3HASCL e 3HAMCL, o que justifica nossa nova estratégia.

Para a confirmação da presença dos genes dos plasmídios recebidos, três colônias resultantes da eletroporação foram selecionadas e nomeadas TGR1, TGR2 e TGR3 (contendo pBluescript SK⁺::B28+) e uma colônia de pds37. Esses clones foram submetidos a uma amplificação diretamente de colônia (figura 31) com os 4 pares de primers descritos anteriormente para a classe III. O gene *phaE* não foi detectado pelo primer phaE3R/F

(GALINDO, 2011), mas acredita-se que pode ser um problema do iniciador, uma vez que ele nunca se mostrou eficiente na amplificação desse gene.

Figura 31- Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) da reação de pcr das colônias TGR1, TGR2, TGR3 e pds37, com os primers P1/P2, Haphapcr1/2, phaE3R/F e phaC3R/F.

5.8 Construção de recombinantes

Nesta etapa foram feitos experimentos para expressar o gene *phaCE* de *Allochromatium vinosum* e de *Thiocapsa pfennigii* em uma linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 344 (FILIPOV, 2000) e *Pseudomonas* sp. LFM 461 (GOMEZ, 2000a), ambas PHA negativas.

5.9 Construção do pBBR1MCS-2 abrigando *phaCE* de *Allochromatium vinosum*

A linhagem de *E.coli* que abrigava o plasmídeo pds37 foi submetida à extração plasmidial. A seguir, procedeu-se a digestão simples do plasmídeo pds37::*phaCE* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PvuI* para lineariza-lo e conferir o tamanho esperado ≈6kb e

digestão dupla com as mesmas enzimas para a retirada o inserto, com tamanho esperado $\approx 3\text{Kb}$ (Figura 32). O tamanho esperado do plasmídeo linearizado após a digestão com a enzima de restrição *PvuI* foi confirmado (6 kb) como é possível observar na canaleta 2 e 3. Entretanto, não foi possível realizar a retirada do inserto com a digestão dupla, pois não obteve-se a banda no tamanho esperado de 3kb. A partir dos resultados obtidos, em que não foi possível a remoção do gene *phaCE* optou-se por fazer a amplificação do mesmo, através de uma reação de PCR.

Figura 32- Perfil eletroforético dos fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo *pds37::phaCE.1-pds37* sem digerir, 2- Digestão simples com *PvuI* e 3- Digestão dupla com *EcoRI* e *PvuI*

Inicialmente, para a padronização da reação de PCR, foram empregadas diversas temperaturas de anelamento, para a verificação da temperatura mais adequada para o primer que estava sendo utilizado. Na figura 33 é possível observar que a temperatura de anelamento em que havia amplificação apenas da banda de 3kb, correspondente aos genes *phaCE* foi de 68 °C. As temperaturas mais baixas, permitiram a amplificação de bandas inespecíficas.

Figura 33-Perfil eletroforético dos amplicons resultantes de uma reação de PCR com diferentes temperaturas de anelamento. 1- 60°C, 2-62,8°C, 3- 65.5°C e 4 -68°C

Com o objetivo de obter o extremidades coesivas previamente à ligação do gene amplificado acima ao plasmídeo pBBR1MCS2, ambos foram submetidos a uma digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Uma vez linearizado o plasmídeo e os genes *phaCE* digeridos, foi realizada a ligação, utilizando a enzima T4 ligase, para obter a construção pBBR2::*phaCE*.

O produto da ligação foi purificado previamente à eletroporação com o PCR Purification Kit da Qiagen como descrito em Materiais e Métodos. A concentração do produto purificado após medição no Nanodrop foi de 64.7ng/μl.

Uma vez purificado, o plasmídeo pBBRMCS-2::*phaCE* foi inserido por eletroporação em *Burkholderia sacchari* LFM 344 e *Pseudomonas* sp. LFM 461, as quais previamente se tornaram eletrocompetentes como o protocolo descrito em anteriormente. Os clones positivos de *B. sacchari* foram selecionados baseados no marcador de resistência (Km^R).

Foi realizada uma PCR de colônia com vários clones positivos para confirmar a presença do inserto *phaCE* (≈3Kb) (fig 34).

Figura 34-Perfil eletroforético resultante da amplificação do gene *phaCE* das colônias de *B. sacchari* 344 resultantes da eletroporação. Cada canaleta corresponde a um clone diferente.

Para confirmar que as colônias de *B. sacchari* 344 realmente estavam portando os genes *phaCE*, um amplicon obtido no PCR de colônia foi enviado para sequenciamento. Abaixo segue a sequência obtida, que possui 94% de similaridade com PHA sintase (subunidade E) de *Allochrodatum vinosum* DSM 180.

Não foram obtidos clones positivos para *Pseudomonas* LFM 461 através da eletroporação. Então foi realizada uma conjugação como o protocolo descrito em *Materias e Métodos* utilizando como bactéria doadora uma linhagem de *E. coli* S17 portando o plasmídeo pBBRMCS-2 *phaCE*. Foram obtidas três colônias a partir da conjugação e todas foram utilizadas no ensaio de acúmulo.

5.9.1 Construção do pBBRMCS-2 abrigando *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii*

O resultados das reações de PCR utilizando-se o primer desenhado para a amplificação do gene *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii* foi negativo. As temperaturas de anelamento variaram de 55 °C e 70 °C, mas em nenhuma temperatura foi possível detectar o amplicon.

Os plasmídeos pBluescript SK⁺::B28+ e pBBR1MCS-2 foram digeridos separadamente com a enzima *Bam*HI (Fermentas ®), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose para confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos. O plasmídeo tem 3kb e o inserto 2850pb (Fig 35). A partir do gel de agarose, o inserto de pBluescript SK⁺::B28+ foi retirado e purificado (kit gel extraction QIAGEN) e ligado ao pBBR1MCS-2 digerido (Fig 36) com a enzima ligase (Thermo scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 1µL da ligação foi utilizada para a eletroporação em *E. coli* Dh5α, que foram semeadas em meio de cultura LB sólido contendo X-gal e IPTG para o teste de alfa complementação. As colônias brancas foram selecionadas, inferindo-se pela sua coloração que seus respectivos plasmídeos estavam abrigando o inserto. Após a seleção das colônias, seus plasmídeos (pBBR1MCS-2:: *phaCE* de *Thiocapsa pfennigii*) foram extraídos e posteriormente inseridos por eletroporação na LFM 344 e por conjugação na LFM 461, de acordo com o protocolo descrito nos materiais e métodos.

Figura 35-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), da digestão de pBluescript SK⁺::B28+ com *Bam*HI. A seta vermelha indica o inserto de 2.850 pb contendo *phaC* e *phaE* de *Thiocapsa pfennigii*

Figura 36-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v), da digestão de pBBR2 com *Bam*HI.

5.9.2 Construção do pBBR1MCS-2 abrigando *phaC* de *Burkholderia sacchari*

Utilizando o primer desenhado para a amplificação do gene *phaC* de *Burkholderia sacchari*, realizou-se uma reação de PCR que teve como DNA molde o DNA genômico da linhagem em questão. Para avaliar se a amplificação havia ocorrido, submeteu-se a amostra resultante da reação de PCR a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Fig. 37), no qual foi possível visualizar a banda de aproximadamente 2000 pb. O sequenciamento do produto de PCR confirmou que se tratava do gene *phaC*.

Figura 37-Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8% (p/v) resultante da amplificação do gene *phaC* de *B. sacchari*

5.10 Avaliação da produção de PHA pelos recombinantes

5.10.1 Avaliação qualitativa da produção de PHA em meio mineral sólido

As linhagens recombinantes de *B. sacchari* e *P. putida* obtidas foram incubadas em meio mineral sólido, contendo glicose (10g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g/L) como fonte de carbono durante 5 dias fornecendo assim as condições apropriadas para o acúmulo de PHA. Observou-se o resultado, baseado na coloração apresentada pelas colônias, após a utilização do corante Sudan Black. Por ser um corante lipofílico, ele reage com os grânulos de PHA, o que resulta em uma coloração azul escuro (SCHLEGEL, 1970). Quando a colônia não está produzindo PHA o corante não fixa tão bem na célula, deixando a mesma com uma coloração azul bem clara. Na figura 48B, é possível notar que a maior parte das colônias que possuem o pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum* apresentam uma coloração bem escura, enquanto as colônias abrigando pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii* apresentaram coloração mais clara. Já na figura 49B é possível notar que apenas os controles positivos apresentaram coloração escura, o que indica

que as bactérias recombinantes não estão acumulando PHA. Para fins de comparação, ambas as placas possuíam um controle positivo, que corresponde às linhagens selvagens e um controle negativo que correspondem às mutantes PHA⁻. Os controles positivos, como podem ser observados nas figuras 38 e 39 apresentam coloração escura, enquanto os controles negativos apresentam coloração bem clara.

Figura 38-Avaliação da capacidade de acúmulo de polímero pelos recombinantes, em colônias coradas por Sudan Black B.

A identificação dos clones numerados na foto se encontra a seguir: 1, 13, 25, 37 e 49: Controle positivo (*B. sacchari* 101 com pBBR2 sem inserto)

2, 14, 26, 38 e 50: Controle negativo (*B. sacchari* 344 com pBBR2 sem inserto)

3, 15, 27, 39 e 51: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 1

4, 16, 28, 40 e 52: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 2

5, 17, 29, 41 e 53: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 3

6, 18, 30, 42 e 54: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 1
 7, 19, 31, 43 e 55: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 2
 8, 20, 32, 44 e 56: *B. sacchari* 344 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 3

Figura 39-Avaliação da capacidade de acúmulo de polímero pelos recombinantes, em colônias coradas por Sudan Black B.

A identificação dos clones numerados na foto se encontra a seguir:

- 1, 13, 25, 37 e 49: Controle positivo (*P. putida* 046 com pBBR2 vazio)
- 2, 14, 26, 38 e 50: Controle negativo (*P. putida* 461 com pBBR2 vazio)
- 3, 15, 27, 39 e 51: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 4
- 4, 16, 28, 40 e 52: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 5
- 5, 17, 29, 41 e 53: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *C. vinosum*) colônia 6
- 6, 18, 30, 42 e 54: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 4
- 7, 19, 31, 43 e 55: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 5

8, 20, 32, 44 e 56: *P. putida* 461 (pBBR2::*phaEC* de *T. pfennigii*) colônia 6

Por ser um teste visual, o Sudan Black tem uma certa subjetividade, entretanto é uma forma eficiente para selecionar os recombinantes mais promissores para a realização da avaliação quantitativa.

5.10.2 Avaliação quantitativa da produção de PHA em meio mineral líquido

Dois grupos de ensaios foram realizados: um deles utilizando glicose como única fonte de carbono e outro combinando a glicose com um ácido orgânico. No primeiro grupo de experimentos, as linhagens recombinantes de *B. sacchari* e *P. putida* foram inoculadas em LB líquido contendo canamicina e incubadas em agitador rotativo a 30 °C por 24 horas. Após esse período, 5 mL do inóculo foram depositados em meio mineral com glicose 10g/L e canamicina. Foram retiradas amostras com 24 e 72 horas de cultivo para análise de determinação de biomassa, e PHA. Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicata, conforme previamente descritos (GOMEZ et al., 1996).

O segundo grupo de experimentos foi conduzido de modo similar, com a diferença de que após 24 horas de cultivo, foi adicionado o ácido orgânico, na concentração de 1g/L e o inóculo foi mantido em agitação por mais 48 horas. Foram retiradas amostras com 24 e 72 horas de cultivo para análises posteriores (determinação de biomassa e PHA). Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicata, conforme previamente descritos (GOMEZ et al., 1996). Os resultados se encontram nas tabelas a seguir:

Tabela 12-Avaliação da capacidade de produção de PHA por recombinantes de *B. sacchari* abrigando genes codificadores de PHA sintase do tipo III, a partir de glicose (10g/L) como única fonte de carbono

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)		PHA (g/L)		
			3HB						
LFM 101 pBBR1MCS-2	24	4,62	±0,1	100,00	±0,0	43,30	±4,3	2,00	±0,23
	72	4,90	±0,1	100,00	±0,0	41,31	±6,0	2,02	±0,25
LFM 344 pBBR1MCS-2	24	3,33	±0,2	100,00	±0,0	1,47	±0,4	0,05	±0,01
	72	3,67	±0,1	100,00	±0,0	1,47	±0,4	0,05	±0,01
LFM 344 pBBR1MCS- 2::phaCBS	24	4,20	±0,2	100,00	±0,0	39,27	±4,9	1,65	±0,27
	72	4,61	±0,0	100,00	±0,0	26,91	±3,5	1,24	±0,16
LFM 344 pBBR1MCS- 2::phaCcv	24	4,90	±0,3	100,00	±0,0	46,10	±4,7	2,25	±0,17
	72	5,11	±0,3	100,00	±0,0	40,65	±6,7	2,09	±0,47
LFM 344 pBBR1MCS- 2::phaCTp	24,00	2,15	±0,60	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
	72,00	3,45	+0,42	0,00	+0,00	0,00	+0,00	0,00	+0,00

MSC – Massa seca celular, 3HB- 3-hidroxibutirato

Tabela 13-Avaliação da capacidade de produção de PHA por *B. sacchari* LFM 101 abrigando o plasmídeo pBBR1-MS2, a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).

Fonte de carbono	Tempo	pH		MSC		PHA (mol%)						PHA		PHA	
	(h)					(g/L)	3HB		3HV		3HHx		(%MSC)		(g/L)
Glicose + propanoato	24	6,14	±0,08	2,64	±0,05	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	43,89	±2,48	1,15	±0,06
	72	7,28	±0,01	5,13	±0,30	95,21	±0,58	4,78	±0,59	0,00	±0,00	45,50	±9,75	2,34	±0,59
Glicose + butirato	24	6,02	±0,03	2,46	±0,07	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	40,14	±1,41	0,98	±0,00
	72	7,34	±0,01	5,17	±0,05	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	42,29	±1,55	2,18	±0,09
Glicose + valerato	24	6,05	±0,07	2,92	±0,28	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	42,71	±1,83	1,24	±0,07
	72	7,20	±0,01	5,12	±0,05	88,31	±0,67	11,69	±0,67	0,00	±0,00	44,52	±4,79	2,28	±0,26
Glicose + hexanoato	24	6,16	±0,21	2,43	±0,10	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	41,53	±0,97	1,01	±0,05
	72	7,08	±0,02	4,93	±0,19	99,70	±0,06	0,00	±0,00	0,30	±0,06	31,23	±5,85	1,53	0±/,23
Glicose + heptanoato	24	5,40	±0,05	3,50	±0,26	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	27,70	±2,64	0,96	±0,01
	72	4,40	±0,06	4,93	±0,11	63,92	±3,54	36,07	±3,54	0,00	±0,00	4,02	±0,44	0,20	±0,01
Glicose + octanoato	24	5,37	±0,03	2,33	±0,80	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	28,88	±2,46	0,67	±0,27
	72	6,77	±0,11	4,74	±0,19	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	20,26	±6,99	0,96	±0,31
Glicose + nonanoato	24	5,55	±0,11	3,87	±0,09	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	34,40	±7,58	1,33	±0,28
	72	6,82	±0,14	4,39	±0,47	82,08	±4,20	17,92	±4,20	0,00	±0,00	37,84	±14,97	1,69	±0,75

MSC – Massa seca celular, 3HB- 3-hidroxibutirato, 3H – 3-hidroxivalerato 3HHx – 3-hidroxihexanoato,

Tabela 14-Avaliação da capacidade de produção de PHA por *B. sacchari* LFM 344 abrigando o gene *phaC* de *B. sacchari* , a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).

Fonte de carbono	Tempo (h)	pH		MSC (g/L)		PHA (mol%)						PHA (%MSC)		PHA (g/L)	
						3HB		3HV		3HHx					
Glicose + propanoato	24	6,41	±0,00	2,46	±0,09	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	41,70	±4,23	1,02	±0,07
	72	7,26	±0,01	4,69	±0,17	96,53	±0,36	3,46	±0,36	0,00	±0,00	30,67	±1,83	1,44	±0,12
Glicose + butirato	24	6,39	±0,01	2,51	±0,27	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	38,64	±6,88	0,98	±0,27
	72	7,30	±0,02	4,63	±0,08	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	34,76	±2,58	1,61	±0,09
Glicose + valerato	24	6,38	±0,01	2,31	±0,02	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	37,75	±2,32	0,87	±0,04
	72	7,19	±0,02	4,14	±0,03	84,41	±1,31	15,59	±1,31	0,00	±0,00	28,95	±0,84	1,20	±0,03
Glicose + hexanoato	24	6,38	±0,01	2,44	±0,11	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	38,60	±3,43	0,94	±0,08
	72	7,10	±0,01	3,96	±0,14	99,59	±0,13	0,00	±0,00	0,41	±0,13	22,15	±1,53	0,88	±0,04
Glicose + heptanoato	24	4,40	±0,06	2,17	±0,05	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	34,96	±3,37	0,76	±0,08
	72	5,84	±0,08	3,41	±0,34	69,39	±5,42	30,61	±5,42	0,00	±0,00	55,49	±0,25	1,89	±0,01
Glicose + octanoato	24	5,72	±0,20	2,07	±0,15	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	37,63	±9,72	0,77	±0,16
	72	6,81	±0,50	3,14	±0,37	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	14,74	±13,22	0,44	±0,38
Glicose + nonanoato	24	5,59	±0,49	2,60	±0,52	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	35,47	±4,03	0,91	±0,14
	72	6,65	±0,19	3,00	±0,19	97,23	±0,64	2,76	±0,64	0,00	±0,00	9,44	±0,17	0,28	±0,01

MSC – Massa seca celular, 3HB- 3-hidroxibutirato, 3HV – 3-hidroxivalerato 3HHx – 3-hidroxihexanoato,

Tabela 15-Avaliação da capacidade de produção de PHA por *B. sacchari* LFM 344 abrigando o gene *phaEC* de *Allochromatium vinosum* , a partir de glicose (10g/L) e ácidos orgânicos (1g/L).

Fonte de carbono	Tempo (h)	pH	MSC (g/L)	PHA (mol%)								PHA		PHA	
				3HB		3HV		3HHx		(%MSC)		(g/L)			
Glicose + propanoato	24	6,26	±0,23	4,16	±1,17	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	46,08	±7,14	1,95	±0,77
	72	7,24	±0,01	5,56	±0,18	97,47	±0,61	2,52	±0,61	0,00	±0,00	44,65	±2,71	2,49	±0,22
Glicose + butirato	24	6,15	±0,03	3,56	±0,13	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	46,07	±3,23	1,64	±0,16
	72	7,33	±0,00	5,73	±0,25	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	40,65	±6,74	2,33	±0,42
Glicose + valerato	24	6,17	±0,06	3,47	±0,15	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	41,38	±1,10	1,43	±0,04
	72	7,33	±0,00	5,53	±0,12	86,77	±3,89	13,23	±3,88	0,00	±0,00	48,98	±2,56	2,71	±0,19
Glicose + hexanoato	24	6,17	±0,06	3,53	±0,20	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	50,91	±2,71	1,80	±0,16
	72	7,07	±0,01	5,52	±0,16	98,15	±0,03	0,00	±0,00	1,85	±0,03	50,37	±2,36	2,78	±0,05
Glicose + heptanoato	24	5,84	±0,08	3,55	±0,15	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	55,16	±0,69	1,96	±0,07
	72	7,06	±0,03	5,00	±0,70	92,78	±1,19	7,21	±1,19	0,00	±0,00	45,89	±4,10	2,31	±0,51
Glicose + octanoato	24	5,95	±0,23	2,37	±0,49	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	55,16	±0,69	1,30	±0,31
	72	7,06	±0,04	3,53	±0,45	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	36,03	±4,03	1,27	±0,24
Glicose + nonanoato	24	5,99	±0,14	3,27	±0,31	100,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	56,53	±3,07	1,84	±0,15
	72	6,40	±0,12	3,50	±0,30	97,23	±0,64	2,76	±0,64	0,00	±0,00	55,39	±7,40	1,95	±0,36

MSC – Massa seca celular, 3HB- 3-hidroxibutirato, 3HV – 3-hidroxivalerato 3HHx – 3-hidroxihexanoato,

Tabela 16-Avaliação da capacidade de produção de PHA por recombinantes de *Pseudomonas putida* abrigando genes codificadores de PHA sintase do tipo III, a partir de glicose (10g/L) como única fonte de carbono

Linhagem/ Condições de cultivo	MSC		Composição PHA Mol%												PHA		PHA	
	(g/L)		3HB		3HHx		3HO		3HN		3HD		3HDd		(%MSC)		(g/L)	
LFM 046 pBBR1MCS-2	2,85	±0,05	0,00	±0,0	0,0	±0,0	34,2	±0,4	0,0	±0,0	65,8	±0,4	0,0	±0,0	19,23	±1,9	0,55	±0,06
LFM 461 pBBR1MCS-2	2,72	±0,1	0,00	±0,0	0,0	±0,0	0,0	±0,0	0,0	±0,0	0,0	±0,0	0,0	±0,0	0,00	±0,0	0	±0
LFM 461 pBBR1MCS- 2::phaCBS	2,14	±0,1	67,07	±7,1	8,0	±4,5	0,0	±0,0	0,0	±0,0	8,9	±0,9	16,0	±2,2	2,61	±0,3	0,06	±0
LFM 3461 pBBR1MCS- 2::phaCCV	5,42	±0,0	0,00	±0,0	9,1	±1,2	0,0	±0,0	8,8	±4,1	36,3	±1,9	45,8	±2,8	2,27	±0,1	0,12	±0,01
LFM 461 pBBR1MCS- 2::phaCTp	2,05	±0,05	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00

MSC – Massa seca celular · 3HB - 3-hidroxibutirato · 3HHx – 3-hidroxihexanoato · 3HO – 3-hidroxi octanoato · 3HD – 3-hidroxidecanoato · 3HDd – 3-hidroxidodecanoato.

Tabela 17-Análise da concentração de ácidos orgânicos nas diferentes linhagens, com 24 e 72 horas de cultivo

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Propanoato (g/L)		Butanoato (g/L)		Valerato (g/L)		Hexanoato (g/L)		Heptanoato (g/L)	
LFM 101 pBBR1MCS-2	24	0,44	0,00	0,87	0,36	0,72	0,10	0,97	0,33	1,39	0,15
	72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LFM 344 pBBR1MCS-2::phaC _{BS}	24	0,72	1,17	0,90	1,17	0,86	0,16	0,69	0,09	1,30	0,06
	72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LFM 344 pBBR1MCS-2::phaC _{cv}	24	0,64	0,02	0,78	0,08	0,65	0,05	0,73	0,20	1,30	0,04
	72	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Os cultivos em glicose foram feitos com o objetivo de controlar a produção dos polímeros na ausência de um co-substrato. Como é possível observar na tabela 12, houve apenas a produção de P3HB quando somente a glicose foi fornecida como fonte de carbono, mesmo após 72 horas de cultivo. Nos cultivos que foram acrescidos de ácido após 24 horas (tabelas 13,14 e 15), momento em que a amostra foi retirada, também observou-se apenas a presença de P3HB. Esse resultado é esperado, uma vez que até o momento da coleta da amostra, apenas a glicose estava disponível como fonte de carbono. Nas primeiras 24 horas, a célula bacteriana utiliza a glicose preferencialmente para o crescimento, entretanto pode haver o uso da fonte de carbono para o acúmulo de P3HB, o que justifica a produção nas primeiras 24 horas de cultivo (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998).

A linhagem LFM 344 contendo o plasmídeo pBBRMCS-2 abrigando o gene *phaC* de *B. sacchari* foi construída com o objetivo de avaliar se a expressão do gene é alterada quando este está presente em um plasmídeo em comparação com a presença do gene integrado ao cromossomo bacteriano (LFM 101).

Após 72 horas de cultivo, foi possível avaliar a produção de polihidroxialcanoatos após a utilização dos ácidos graxos como fonte de carbono. Nos cultivos utilizando ácidos graxos com números de carbono pares, como ácido butírico e ácido octanóico (tabela 13-15) observou-se a produção exclusiva de P3HB em todas as linhagens. Essa dado já foi relatado na literatura, utilizando os mesmos ácidos com a linhagem selvagem (LFM 101), que também foi capaz de acumular apenas P3HB.

A partir das análises feitas no cromatógrafo gasoso (tabela 17), foi possível observar que todos os ácidos foram totalmente consumidos após 72 horas de cultivo em todas as linhagens, o que justifica o aumento do pH em comparação com o valor de 24 horas .

Os ensaios de acúmulo feitos com o gene *phaEC* de *Thiocapsa pffenigii*, nas linhagens LFM 344 e LFM 461, indicaram que esse gene não foi capaz de reestabelecer a capacidade de acúmulo dessas cepas. Visto que a o gene não foi funcional em nenhuma das duas linhagens utilizadas, é possível que haja algum problema na sequência ou estrutura do mesmo.

Após 72 horas de cultivo utilizando ácidos graxos com números ímpares de carbono, foi possível observar a incorporação de monômeros de 3HV . O ácido valérico, que contém 5 carbonos em sua estrutura, é diretamente utilizado como precursor do monômero nas três linhagens testadas (HOLMES, 1985a). Quando o cultivo é alimentado com ácido heptanoico

também é possível observar a incorporação de monômeros de 3HV, apesar de o ácido conter 7 carbonos em sua estrutura. Isso se justifica pelo fato de que este ácido é metabolizado pela β oxidação, que elimina dois átomos de carbono na forma de acetil, o que resulta em um intermediário remanescente de 5 carbonos que poderia ser incorporado ao polímero na forma de 3HV. O mesmo acontece quando utiliza-se o ácido nonanoico que perde 4 carbonos, dois a cada ciclo da β oxidação, resultando igualmente em um intermediário de 5 carbonos (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; HOLMES, 1985A; MENDONÇA, 2009; MENDONÇA et al., 2014; SLATER et al., 1998).

Na tabela 15, é possível observar que a fração de HV incorporada pela linhagem LFM 344 abrigando *phaC* de *B. sacchari* foi de 30,6 mol%, valor muito aproximado do valor observado na literatura para a linhagem selvagem LFM 101 que é de 28,1 mol% (MENDONÇA et al., 2014). O mesmo ocorre quando o ácido nonanoico é utilizado, onde a fração de HV da linhagem selvagem (17,92 mol%) é muito próximo ao valor obtido pela recombinante 344 abrigando *phaC* de *B. sacchari* (18,3 mol%).

Entretanto essa equivalência de valores não é observada em relação ao recombinante LFM 344 abrigando *phaC* de *C. vinosum*. A fração de HV incorporado no cultivo contendo ácido heptanoico é de 7,21mol % e quando o ácido nonanoico é utilizado essa fração é de 2,76 mol%, valores significativamente menores quando comparado aos controles. Essa queda na fração de HV incorporado, se deve pela atividade da *pha* sintase de classe III ter sido utilizada nesse recombinante. Esse tipo de PHA sintase tem maior afinidade por monômeros de cadeias carbônicas contendo de 6 a 8 carbonos, e não de 5 como a PHA sintase de classe I presente nos controles (REHM, 2003).

Na tabela 16 pode-se observar que houve a expressão dos genes nos recombinantes de *B. sacchari* construídos portando a PHA sintase do tipo III oriunda de *Allochromatium vinosum* (*phaEC_{Cv}*), que permitiu que o mutante voltasse a acumular PHA. Quando apenas a glicose é utilizada como fonte de carbono, a *phaEC_{Cv}* se mostra mais eficiente que a PHA sintase nativa, uma vez que na linhagem recombinante, abrigando o referido gene, observou-se um acúmulo de 46,30% da massa seca celular, e na linhagem selvagem o valor foi de 43,30% da massa seca celular.

A partir de glicose (tabela 12), recombinantes portando *phaEC_{Cv}* acumularam polímero composto somente de monômeros de 3-hidroxibutirato, e o teor de PHA acumulado atingiu cerca de 50% da biomassa celular. Esses dados são condizentes com a literatura, que

demonstram um acúmulo de cerca de 60% da massa seca celular na linhagem selvagem (MENDONÇA, 2009).

Considerando informações preliminares (BUFFONI, 2006, MENDONÇA et al, 2014) com fortes indícios de que o cultivo de glicose juntamente com o ácido hexanóico, sob condições de acúmulo, favorecia a incorporação de 3HHx à cadeia polimérica, parte dos ensaios foram realizadas na presença do ácido. No presente trabalho quando o ácido hexanoico foi fornecido na fase de acúmulo, a linhagem selvagem produziu um polímero com 0,30 mol% de 3HHx . Em contrapartida, nas mesma condições de cultivo, na linhagem abrigando *phaEC_{CV}* a fração de 3HHx foi de 1,85 mol%.

Em estudo realizado para verificar a produção de PHA pelas bactérias púrpuras sulfurosas indicou que a maior parte delas incorpora apenas monômeros de PHB. Entretanto, algumas linhagens como *Allochromatium vinosum* 161 1, *Allochromatium purpuratum* BN5500 e *Lamprocystis* foram capazes de incorporar 3- HV a partir de ácidos com número ímpar de carbono (LIEBERGESELL, 1991). Quando o gene de *Allochromatium vinosum* D, foi clonado em *E. coli* apenas 3HB foi produzido (LIEBERGESELL , 1992).

Tendo em vista que a linhagem selvagem da *Allochromatium vinosum* D, a qual teve seu gene clonado no presente trabalho, foi capaz de incorporar apenas 3HB quando clonada em *E. coli*, fica evidente que a fonte de carbono e o arcabouço metabólico da célula são determinantes para a composição do polímero (GOMEZ, 2000b).

Na literatura (LIEBERGESELL et al., 1993) foi registrada a expressão do gene da *phaEC* de *Allochromatium vinosum* em *Pseudomonas putida*, obteve-se até 14 mol% de HHx quando se utilizou octanoato como fonte de carbono. Entretanto, quando se utilizou apenas glicose como fonte de carbono a fração de 3HHx obtida é de 9,11 mol%. A presença do gene *phaC* de *B. sacchari*, que tem afinidade por substratos contendo de 3 a 5 carbonos, aumentou significativamente a fração de HB presente no polímero (tabela 14), de 0 para 67 mol% (REHM, 2003).

Ao que parece, o gene *phaEC* de *Allochromatium vinosum* tornou a linhagem LFM 461 capaz de incorporar monômeros de 3HN, o que não ocorreu nos controles. Quando a mesma cepa foi testada com o gene da *Thiocapsa pffenigii* o valor alcançado foi de 47,3mol % utilizando-se a mesma fonte de carbono. Vale ressaltar que apesar de ter menor capacidade de incorporar 3HHX, quando comparada com outras linhagens, a *B. sacchari* se destaca pelo seu rápido crescimento em sacarose, e vários estudos estão sendo feitos no sentido de

melhorar sua capacidade de utilizar xilose e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (LOPES, 2009; LOPES et al., 2009; MENDONÇA, 2009).

6 CONCLUSÕES

- A biblioteca metagenômica, apesar de constituir uma rica fonte de novos genes, possui diversas limitações. Entre elas, estão as técnicas de detecção dos genes que necessitam de rigorosa padronização e verificação previa da eficiência, bem como o fato de que muitas vezes os genes mesmo quando detectados, não estão necessariamente clonados com sua estrutura integral em razão da técnica de montagem da biblioteca.

Entre os recombinantes obtidos nesse trabalho observou-se que:

- Os genes *phaEC* de *Thiocapsa pffienigii* não foram capazes de restaurar a capacidade de produzir PHA nos mutantes de *B. sacchari* e *Pseudomonas* sp afetados no gene codificador de sua PHA sintase nativa

- O recombinante de *B. sacchari* abrigando os genes *phaEC* de *Allochromatium vinosum* quando submetido as fonte de carbono glicose e hexanoato produziu um polímero com conteúdo de 3HV inferior ao da linhagem selvagem

- *B.sacchari* portando os genes *phaEC* de *Allochromatium vinosum*, na presença de ácido hexanoico, gerou um polímero contendo uma fração de 3HHx três vezes maior do que aquela observada no polímero produzido pela a linhagem selvagem.

- O recombinante de *Pseudomonas* sp abrigando o gene *phaEC* de *Allochromatium vinosum*, quando utilizado glicose como fonte de carbono aumentou a capacidade da linhagem LFM 461 de incorporar monômeros 3HHx em relação a linhagem selvagem 046

Essas linhagens poderão ser empregadas na produção de PHA com composição variada, controlando-se a incorporação de frações 3HHx o que deve refletir nas suas propriedades, ampliando suas possibilidades de aplicação

REFERÊNCIAS*

- ABE, H. et al. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16, n. 3, p. 115-119, 1994. ISSN 0141-8130.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990. ISSN 0146-0749.
- ANEJA, P. et al. Heterologous complementation of the exopolysaccharide synthesis and carbon utilization phenotypes of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 polyhydroxyalkanoate synthesis mutants. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 239, n. 2, p. 277-283, 2004. ISSN 0378-1097.
- ANTONIO, R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 182, n. 1, p. 111-117, Jan. 2000. ISSN 0378-1097.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings Pub. Co., 1997.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- BOCANEGRA, J. K. et al. Influence of pH on the molecular weight of Poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, May. 2013. ISSN 1559-0291.
- BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA Seq.**, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996. ISSN 1042-5179.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 7, p. 2647-253, Jul. 1997. ISSN 0099-2240.
- BRAMER, C. O. et al. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, pt. 5, p. 1709-1713, Sep. 2001. ISSN 1466-5026

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 200

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.**, v. 65, n. 2-3, p. 127-161, Oct. 1998. ISSN 0168-1656.

BUENO NETO, C. L. et al. **Processo para produzir polihidroxialcanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar.** 1991.

BUFFONI, E. **Avaliação da Composição de Polímeros Biodegradáveis Produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de Diferentes Substratos.** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, USP, 2006.

CHEEMA, S. et al. Exploiting metagenomic diversity for novel polyhydroxyalkanoate synthases: production of a terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) with a recombinant *Pseudomonas putida* strain. **Bioresour. Technol.**, v. 103, n. 1, p. 322-328, Jan. 2012. ISSN 1873-2976.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, Aug. 2009. ISSN 1460-4744.

DIMITROV, M. R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoato.** 2009. (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FILIPOV, M. C. S. **Obtenção e caracterização de mutantes de *burkholderia sp. ipt101* deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato - um plástico biodegradável.** 2000. 154 f. (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /IPT, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000.

GALINDO ROZO, Y. P. **Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de mata atlântica.** 2011. 119 f. (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GILLESPIE, D. E. et al. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002. ISSN 0099-2240.

GODOY, F. A. et al. Poly-beta-hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 36, n. 5, p. 315-320, 2003. ISSN 0266-8254.

GOMES, R. S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica.** 2009. (Doutorado) - Instituto de Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas sp* de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação**

da composição e obtenção de mutantes. 2000a. (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000a.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos:** avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 2000. (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2000b.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil Gram-negative bacteria as regards polyhydroxyalkanoic acids yields from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 785-789, 1996.

GUILLARD, R. R.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. **Can. J. Microbiol.**, v. 8, p. 229-239, 1962. ISSN 0008-4166.

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** New York: Plenum Press, 1962. 26-60 p.

HAI, T.; HEIN, S.; STEINBÜCHEL, A. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19. **Microbiology**, v. 147, pt. 11, p. 3047-3060, 2001. ISSN 1350-0872.

HAI, T. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in sulfate-reducing bacteria and identification of a class III PHA synthase (PhaEC) in *Desulfococcus multivorans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 8, p. 4440-4448, 2004. ISSN 0099-2240.

HOLMES, P. A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technology.**, v. 16, p. 32-36, 1985.

HUISMAN, G. W. et al. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 1949-1954, 1989. ISSN 0099-2240.

HYAKUTAKE, M. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by class IV PHA synthases employing *Ralstonia eutropha* PHB(-)4 as host strain. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 75, n. 8, p. 1615-1657, 2011. ISSN 1347-6947.

KIDWELL, J.; VALENTIN, H. E.; DENNIS, D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1391-1398, 1995. ISSN 0099-2240.

KOVACH, M. E. et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, n. 5, p. 800-802, 1994. ISSN 0736-6205.

LANGENBACH, S.; REHM, B. H.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 150, n. 2, p. 303-309, 1997. ISSN 0378-1097.

LEE, I. Y. et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **J. Ferm. Bioeng**, v. 81, p. 255-258, 1996.

LEFEVRE, F. et al. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. **Res Microbiol**, v. 159, n. 3, p. 153-161, 2008. ISSN 0923-2508.

LIEBERGESELL, M.; HUSTCDC, E.; TIMM, A.; STEINBUCHER, A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W.; AMP, SCHLEGEL. Formation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Archives of Microbiology*, v. 155, p.415-421 1991.

LIEBERGESELL, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 292-300, 1993.

LIEBERGESELL, M.; RAHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Allochromatium vinosum* enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, n. 2, p. 186-194, 2000. ISSN 0175-7598.

LIEBERGESELL M, S. A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 135-150, 1992.

LIEBERGESELL, M. et al. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Allochromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. **Eur. J. Biochem.**, v. 226, n. 1, p. 71-80, 1994. ISSN 0014-2956.

LOPES, M. S. et al. Role of CcpA in polyhydroxybutyrate biosynthesis in a newly isolated *Bacillus* sp. MA3.3. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n. 2, p. 63-69, 2011. ISSN 1660-2412.

LOPES, M. S. G. **Produção de plásticos Biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2009. 131 f. (Doutorado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

LOPES, M. S. G. et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal Microb. Biotech**, v. 25, p. 1751-1756, 2009.

LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 6, p. 510-516, Jun 2005. ISSN 1740-1526.

LORENZ, P. et al. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 572-577, Dec. 2002. ISSN 0958-1669.

LÍCIO, D. C. P. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase.** 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2011.

M, S.; N, A.; A., S. Ecological and physiological studies on purple sulphur bacteria (Chromatiaceae) at aswan high dam lake. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science.**, v. 4, p. 462-467, 2008.

MASSINI, K. C. **Bioprospecção de compostos bioativos em uma biblioteca metagenômica.** 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. et al. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **Applied Microbiology**, Submetido.

MENDONÇA, T. T. **Isolamento de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado). Microbiologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. T. et al. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 116, n. 4, p. 815-829, Apr. 2014. ISSN 1365-2672.

MIYAKE, M. et al. Control of poly-beta-hydroxybutyrate synthase mediated by acetyl phosphate in cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 16, p. 5009-5013, Aug. 1997. ISSN 0021-9193.

NODA, I. et al. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 580-586, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 1525-7797.

PANDEY, G. et al. Extracting the hidden features in saline osmotic tolerance in Saccharomyces cerevisiae from DNA microarray data using the self-organizing map: biosynthesis of amino acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 75, n. 2, p. 415-426, May 2007. ISSN 0175-7598.

PARK, S. J. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 248-254, 2001. ISSN 1525-7797.

PARK, S. J. et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 6, p. 1196-1206, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1873-1899.

PEREIRA, E. M. **Clonagem de genes do ciclo de 2-metilcitrate e avaliação de estratégias para a obtenção de mutantes prp de *Burkholderia sacchari*, produtora de plástico biodegradável.** 2002. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

PEREIRA, E.M. **Avaliação da influência de genes do catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *Burkholderia sacchari* e outras bactérias.** 2007. Tese (Doutorado) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2007.

PEREIRA, E. M. **Diversidade bacteriana de um latos solo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica.** 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2003.

POLI, A. et al. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 693-695, 2011. ISSN 1472-3654.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e intermediários químicos.** Relatório técnico no. 84396-205. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência Tecnologia e Inovação, 2006. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf> Acesso em: 24 set. 2014.

QUILLAGUAMÁN, J. et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, Feb 2010. ISSN 1432-0614.

REES, H. C. et al. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, v. 7, n. 5, p. 415-421, Oct 2003. ISSN 1431-0651.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 376, pt. 1, p. 15-33, Nov 2003. ISSN 1470-8728.

REHM, B. H.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, n. 1-3, p. 3-19, 1999 Jun-Jul 1999. ISSN 0141-8130.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

RODRIGO, M. P. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 439-447, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

SCHALLMEY, M. et al. Harvesting of novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase encoding genes from a soil metagenome library using phenotypic screening. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 321, n. 2, p. 150-156, Aug. 2011. ISSN 1574-6968.

SCHLEGEL HG, L. R., KRAUSS I. The isolations of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. **Arch. Microbiol.**, v. 71, p. 283-294, 1970.

SHAMALA, T. R. et al. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 3, p. 369-374, 2003. ISSN 1364-5072.

SHEU, D. S.; WANG, Y. T.; LEE, C. Y. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, v. 146, pt. 8, p. 2019-2025, Aug. 2000. ISSN 1350-0872.

SILVA, L. et al. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. **Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F. et al. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**. v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, L.F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, n. 6, p. 245-254, Jul 2004. ISSN 1367-5435.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering**: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SIMON-COLIN, C. et al. A novel *mcl* PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezenei* sp. nov., isolated from a 'kopara' mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. **J Appl. Microbiol.**, v. 104, n. 2, p. 581-586, Feb. 2008. ISSN 1365-2672.

SLATER, S. et al. Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 8, p. 1979-1987, Apr. 1998. ISSN 0021-9193.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D. Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 532-7, 2005. ISSN 1525-7797.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, n. 6, p. 690-694, Jun. 2000. ISSN 0175-7598.

SOLAIMAN, D. K. Y. Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase *phaC1* and *phaC2* genes. **Biotech. Lett.**, v. 24, p. 245-250, 2002.

SPIEKERMANN, P. et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 2, p. 73-80, Jan. 1999. ISSN 0302-8933.

STEINBUCHER, A.; VALENTIN, H. E. DIVERSITY OF BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOIC ACIDS. **Fems. Microbiology. Letters**, v. 128, n. 3, p. 219-228, May 1995. ISSN 0378-1097.

STEINBÜCHER, A. **Polyhydroxyalkanoic acids**. Novel materials from biological sources. Macmillan, 1991.

STEINBÜCHER, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 71, p. 81-123, 2001. ISSN 0724-6145.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

TARONCHER-OLDENBURG, G.; NISHINA, K.; STEPHANOPOULOS, G. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 10, p. 4440-4448, Oct. 2000. ISSN 0099-2240.

TIPPMANN, H.-F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 82-87, 2004.

TORSVIK, V. et al. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **J. Biotechnol.**, v. 64, n. 1, p. 53-62, Sep. 1998. ISSN 0168-1656.

VALENTIN, H. E. et al. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria., **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, n. 5, p. 710-716, 1994.

VALENTIN, H. E.; SCHONEBAUM, A.; STEINBUCHER, A. Identification of 5-hydroxyhexanoic acid, 4-hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new

constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 46, p. 261-267, 1996.

WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. **Genome Res.**, v. 12, n. 9, p. 1434-1444, Sep. 2002. ISSN 1088-9051.

ZHENG, L. Z. et al. Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 252, n. 2, p. 299-307, Nov. 2005. ISSN 0378-1097.

APÊNDICE - Resultados do sequenciamento

- Clone P5E6

Banda 750 pb - 95% de similaridade com hypothetical protein de *E.coli*

```
CCGCGCGCGATAcGGGTGCCAGGAGAACTGGTTTGCTGGATAAGGCACTGGCCGCGA
TTTCTGAGGCTTCTTTACCGCTAATTTCTTGCCGCATCCATTCCC GCGCAGCTTCTGGC
GACAGTACCAGTGGGCGGCGGTCATGAATATCTACCAGACCTTGATCTGCCGCAGCA
GTGACGATCAAAAATCCTTCGGCTTCGTCACCACGCTCAAATGGTGTGCTACCTATCG
CGGCCATAAAAATAGGTTGtCCATCAGCaCGATAGATAAAAAAAGGCTGTTTTTTGTC
GCCTTCTTTTTTCCACTCAAACCAGCCATCGGCAAAACAGATTGCCCGACCATGTTGC
CAGAGCGGTTTAAACATACGACTGGTTGCCGCAGTTTCTACGCGGGCGTTAATCAGCG
GCGGTTT
```

Banda 400pb – 99% de similaridade com Holo -[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

```
GTCACGTTAATCTTTCCATCAATATTGCTTCTTCGTAAAGGCTCGAGTTTTTATGCTAA
AGATTGCAAGTTGCTTGTAAGATAAGTACACTGATCCATAATCGCTGTTGTTGAGG
GTGCATGCTGCACAAAATTAAAGTTAAAAAGTAAACCCCGTTCCTTACCAGTTCGG
GGGTTTTACTTTTTAAAGAGAACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCAC
AAGCATAGTGCCGCTCATCTGCCAGCGTTACATGCATATTGCAACGCCAGCTTTTCC
GCCAGTTTTAATGCCTCGCCCCATAGCCGTAGCCGTGATCATATTGCGAA
```

- Clone P12E3

Banda de 750pb - 99% de similaridade com Holo -[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

```
GCTTCTGTGGCATGGTGTAAGCACAGCAATCTTCAATAACGAAGCCAATTTTA
ATGTACTTACGAATTGGCGGTCACGTTAATCTTTCCATCAATATTGCTTTCTTCG
TAAAGGCTCGAGTTTTTATGCTAAAGATTGCAAGTTGCTTGTAAGATAAGT
AACTGATCCATAATCGCTGTTGTTGAGGGTGCATGCTGCACAAAATTAAAGT
TAAAAAGTAAACCCCGTTCCTTACCAGTTCGGGGGTTTTACTTTTTAAAGAG
AACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGCATAGTGCCGCT
CATCTGCCAGCGTTACATGCATATTGCAACGCCAGCTTTTCCGCCAGTTTAA
ATGCCTCGCCCCATAGCCGTAGCCGTGATCATA
```

Banda de 400pb - 99% de similaridade com Holo -[acyl-carrier-protein] synthase de *E. coli*

CTGTGGCATGGTGTAAAGCACAGCAAATCTTCAATAACGAAGCCAATTTTAATG
TACTTACGAATTGGCGGTCACGTTAATCTTTCCATCAATATTGCTTTCTTCGTA
AAGGCTCGAGTTTTTATGCTAAAGATTGCAAGTTGCTTGTAAAAGATAAGTAC
ACTGATCCATAATCGCTGTTGTTGAGGGTGCATGCTGCACAAAATTAAAGTTA
AAAAGTAAAACCCCCGTTCCCTTACCAGTTCGGGGGTTTTACTTTTTAAAGAGA
ACGGTATTATTTTTAACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGCATAGTGCCGCT
CATCTGCCAGCGTTACATGCATATTTGCAACGCCCAGCTTTTCCGCCAGTTTT
AATGC

- Clone P12G4

Banda de 750 pb – 99% de similaridade com hypothetical protein de *E.coli*

CTGGTTTTACATTACCCACCGCGCGGATACCGGGTGCCAGGAGAACTGGTTTGCTGGAA
CACAGCCACTGGCCGCGATTTCTGAGGCTTCTTTACCGCTAATCTCTTGCCGCATCCATTC
CCGCGCAGCTTCTGGCGACAGTACCAGTGGGCGGCGGTCATGAATATCTACCAGACCTTG
ATCTGCCGCAGCAGTGACGATCAAAAATCCTTCGGCTTCGTCACCACGCTCAAATGGTGT
GCTACCTATCGCGGCCATAAAAAATAGGTTGTCCATCAGCACGATAGATAAAAAAAGGCT
GTTTTTGTGCGCCTTCTTTTTTCCACTCAAACCAGCCATCGGCAAAACAGATTGCCCCGACC
ATGTTGCCAGAGCGGTTTAAACATACGACTGGTTGCCGCAGTTTCTACGCGGGCGTTAAT
CAGCGGCGGTTTATCCCACCATCCGGGAGCATATCCCCAGAAAACCGGATCCAGATGAA
GGTGTTTCATCACGTTCACTGAGCAGTAGGACTTTGGTTCCCGGCGCGACGTTGTATCTGCC
AATGGGTTCCGGATCATAGGAATATCGCGTTCAATATCTTCCGCGAGAA